

Im 11, 2850.3

Université de Montréal

**Expression de l'homéoprotéine Pitx3 au cours du développement de la souris et
caractérisation de son activité transcriptionnelle sur le promoteur de la tyrosine
hydroxylase**

par

Mélanie Lebel

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.SC.)

en biologie moléculaire

août 2000

©Mélanie Lebel, 2000



QH
506
U54
2001
v.002

Identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression de l'homéoprotéine Pitx3 au cours du développement de la souris et
caractérisation de son activité transcriptionnelle sur le promoteur de la tyrosine
hydroxylase

présenté par:

Mélanie Lebel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr David Lohnes, président-rapporteur

Dr Jacques Drouin, directeur

Dr Alain Moreau, codirecteur

Dr Muriel Aubry, membre du jury

Mémoire accepté le:

Sommaire

Les facteurs de transcription à homéodomaine forment une grande famille de protéines impliquées de façon souvent importante lors des différentes étapes du développement embryonnaire. Ces facteurs de transcription sont la plupart du temps exprimés dans des structures précises de l'embryon en développement et l'étude de leur patron d'expression contribue à déterminer quelles sont leurs cibles transcriptionnelles. Pitx3, troisième membre de la sous-famille Pitx, ne fait pas exception à cette règle. Son patron d'expression au cours du développement a été mieux défini dans le cadre de ce projet. Ainsi, des transcrits du gène Pitx3 ont été détectés dans certains dérivés des crêtes neurales, plus précisément l'oeil et le cartilage nasal. Pitx3 est aussi exprimé dans tous les muscles squelettiques (exprimant MyoD) à partir du jour E11.5, ce qui suggère que Pitx3 pourrait avoir un rôle à jouer au cours de la différenciation musculaire. Enfin, le premier site d'expression qui a retenu notre attention fut sans contredit les neurones dopaminergiques du mésencéphale, neurones qui se retrouvent dans la substance noire. Ce groupe de neurones a été étudié de façon soutenue de part son implication dans la maladie de Parkinson. Cette maladie est par ailleurs causée par une dégénérescence des neurones au sein de la substance noire. Au cours du développement de la souris, Pitx3 apparaît dans les précurseurs des neurones dopaminergiques du mésencéphale une demi-journée avant la tyrosine hydroxylase, l'enzyme limitante de la voie de synthèse de la dopamine. Cette concordance nous a mené à poser l'hypothèse selon laquelle Pitx3 serait un régulateur transcriptionnel de la tyrosine hydroxylase. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des expériences de

transfections transitoires dans différentes lignées cellulaires ont été effectuées. Nous avons ainsi démontré que Pitx3 activait le promoteur de la tyrosine hydroxylase. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré qu'un site du promoteur, situé à -319 pb était essentiel pour observer cette activation. Enfin, des expériences complémentaires de liaison *in vitro* ont démontré que Pitx3 liait spécifiquement ce site du promoteur avec une haute affinité. La tyrosine hydroxylase constitue donc la première cible transcriptionnelle identifiée pour Pitx3, ce qui suggère une implication de ce facteur de transcription dans la différenciation et/ou le maintien des neurones dopaminergiques du mésencéphale.

Table des matières

Titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières	v
Listes des figures	viii
Listes des sigles et abréviations	ix

Chapitre 1. Introduction

1.1 Généralités	1
1.2 Facteurs de transcription à homéodomaine	1
1.2.1 Classification des homéoprotéines: familles <i>paired</i> et <i>bicoïd</i>	2
1.2.2 Rôle des protéines à homéodomaine	3
1.2.2.1 Pitx1 et 2	4
1.2.2.2 Pitx3	5
1.3 Les structures transitoires de l'embryon	6
1.3.1 Le somite	6
1.3.1.1 Origine et lignage cellulaire	6
1.3.1.2 Différenciation et marqueurs moléculaires	7
1.3.1.3 Somitomères: muscles et ossature de la tête	10
1.3.2 Les cellules des crêtes neurales	10
1.3.3 Expression de Pitx3	11
1.4 Développement du système nerveux central	12
1.4.1 Origines de la diversité	12
1.4.2 Origine du système nerveux central	12
1.4.3 Établissement des axes et spécification du phénotype neuronal	14
1.4.3.1 Axe antéro-postérieur	14
1.4.3.1.1 Tronc et rhombencéphale	15
1.4.3.1.2 Télencéphale et diencephale	15
1.4.3.1.3 Mésencéphale	16
1.4.3.2 Axe Dorso-ventral	19

1.4.3.2.1 Morphogenèse	19
1.4.3.2.2 Intégration des signaux morphogéniques	22
1.4.4 Les neurones dopaminergiques du mésencéphale	25
1.4.4.1 Morphogenèse	26
1.4.4.2 Développement tardif	27
1.4.4.2.1 Nurr1	27
1.4.4.2.2 Pitx3	29
1.4.4.2.3 Lmx1b	29
1.4.4.3 Maladie de Parkinson et approches thérapeutiques	31
1.4.5 Contrôle de la distribution tissulaire des neurotransmetteurs	34
1.4.5.1 Généralités	34
1.4.5.2 Tyrosine hydroxylase	34
1.4.5.2.1 Études de promoteur <i>in vivo</i>	35
1.4.5.2.2 Études de promoteur en lignées cellulaires	36
Description du projet	44
Chapitre 2. Premier Manuscrit	45
Pitx3 expression in skeletal muscle during mouse embryogenesis	
Résumé	46
Abstract	47
Introduction, results and discussion	48
Materials and Methods	51
Acknowledgments	52
References	53
Figures	55
Figures Legends	59
Chapitre 3. Second manuscrit	61
Pitx3 activates tyrosine hydroxylase promoter via a high affinity binding site	
Résumé	62

Abstract	63
Introduction	64
Material and Methods	67
Results	72
Discussion	76
Acknowledgments	82
References	83
Figures	89
Chapitre 4. Discussion	
4.1 Similarités dans les processus développementaux des structures exprimant Pitx3	96
4.2 Cibles transcriptionnelles de Pitx3.....	99
4.3 Considérations évolutives	100
4.3.1 Évolution des structures	100
4.3.1.1 Pitx3	100
4.3.1.2 Pitx1	102
4.3.1.3 Pitx2	102
4.3.2 Duplication des gènes, acquisition de nouvelles fonctions et évolution...	103
Bibliographie	107
Remerciements	xi

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1. Développement des somites	8
Figure 1.2. Organisation du système nerveux central au cours du développement ...	13
Figure 1.3. Spécification de la barrière mésencéphale-métencéphale (MHB)	17
Figure 1.4. Spécification de l'axe dorso-ventral du tube neural	23
Figure 1.5. Promoteur de la tyrosine hydroxylase	38

Chapitre 2. Premier manuscrit

Figure 2.1. Pitx3 expression in head	55
Figure 2.2. Skeletal muscles express Pitx3 during development	56
Figure 2.3. Dermomyotome expression of Pitx3 follows Myf5 and is concurrent with MyoD	57
Figure 2.4. Co-localization of Pitx3 and MyoD in skeletal muscles	58

Chapitre 3. Second manuscrit

Figure 3.1. Mouse TH promoter contains several Pitx3 putative binding sites	89
Figure 3.2. Pitx3 activates the mouse TH promoter in P19 cells	90
Figure 3.3. Pitx3 effect on TH promoter in different cell lines	91
Figure 3.4. Activity of different members of Pitx and Otx subfamilies on 4 kb TH promoter.....	92
Figure 3.5. Site III is responsible for Pitx3 activation of TH promoter	93
Figure 3.6. Pitx3 binds site III with high affinity <i>in vitro</i>	94

Chapitre 4. Discussion

Figure 4.1. Schéma évolutif	101
-----------------------------------	-----

Liste des sigles et abréviation

AADC:	décarboxylase des acides aminés aromatiques
ADN:	acide déoxyribonucléique
AMP:	adénosine monophosphate
ARN:	acide ribonucléique
bHLH:	basic helix-loop-helix
BMP:	bone morphogenic protein
cDNA:	ADN complémentaire
CRE:	élément de réponse à l'AMP cyclique
CREB:	CRE binding protein
cRNA:	ARN complémentaire
E:	embryonnaire
ES:	souche embryonnaire
FGF:	fibroblast growth factor
Hh:	hedgehog
L-DOPA:	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
Luc:	gène rapporteur luciférase
Kb:	kilobase
MesDA:	dopaminergique mésencéphalique
MHB:	barrière mésencéphale-métencéphale
NBRE:	élément de réponse à NGFI-B
POMC:	pro-opiomelacortine

Pb:	paire de bases
RA:	acide rétinoïque <i>tout-trans</i>
Smo:	smoothened
Shh:	sonic hedgehog
TALE:	three amino acid loop extension
TH:	tyrosine hydroxylase
TRE:	élément de réponse au TPA
Vhh:	vertebrate hedgehog

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Généralités

L'expression correcte des gènes dans les divers groupes de cellules de l'organisme est un processus complexe mais nécessaire au bon fonctionnement de celui-ci. La création de la diversité cellulaire au cours du développement exige un contrôle serré de l'expression des gènes spécifiques de ces cellules et constitue donc un défi pour la compréhension que l'on a des êtres vivants. Plusieurs gènes participent à l'acquisition de la diversité des structures de l'embryon au cours de son développement. Certains types de molécules semblent y être plus fréquemment impliqués que d'autres. Les facteurs de transcription à homéodomaine en sont un bon exemple.

1.2 Facteurs de transcription à homéodomaine

L'homéodomaine est un domaine protéique très conservé comportant 3 hélices α séparées par de courtes boucles β . Sa structure s'apparente, quoique de façon assez éloignée, à un domaine protéique bactérien liant l'ADN, le "helix-turn-helix" (Laughon et Scott 1984; Qian et al. 1989; Wolberger et al. 1991; Kissinger et al. 1990). Il est donc très rapidement apparu que les molécules de ce type liaient des séquences spécifiques d'ADN (Desplan et al. 1985; Hoey et Levine 1988; Desplan et al. 1988), ce qui leur permettait de participer au contrôle de l'expression de gènes-cibles en tant que facteurs de transcription (Jaynes et O'Farrell 1988; Winslow et al. 1989; Krasnow et al. 1989; Driever et Nusslein-Volhard 1989). À ce jour, un nombre impressionnant d'homéoprotéines ont été répertoriées tant chez la levure et les plantes que dans le règne animal (Shepherd et al. 1984; McGinnis et al. 1984; Duboule 1994).

Les études de la structure de l'homéodomaine ont contribué à l'identification des acides aminés essentiels à la formation de cette structure, mais aussi à la capacité de liaison à l'ADN de l'homéodomaine. En effet, la nature de quelques acides aminés (sur les 60 que compte ce domaine) très conservés dans les différents homéodomaines font en sorte que ceux-ci lient le site consensus TAATXX. L'identité des deux derniers nucléotides du site de liaison est déterminée en majeure partie par l'acide aminé situé à la position 50 de l'homéodomaine, situé dans la 3^e hélice α (Treisman et al. 1989; Hanes et Brent 1989; Gehring et al. 1994). Celui-ci est en général basique, quoiqu'il existe à ce niveau des exceptions encore peu caractérisées (Homéodomaines atypiques de la classe TALE, dont l'acide aminé en position 50 est souvent neutre, mais dont l'homéodomaine comporte aussi d'autres particularités (Burglin 1997; Duboule 1994)).

1.2.1 Classification des homéoprotéines: familles *paired* et *bicoïd*

Les premiers efforts de classification des homéoprotéines ont fait appel à l'homologie relative des séquences de ces homéoprotéines, mais aussi à la conservation d'autres domaines protéiques à l'extérieur de l'homéodomaine. Les domaines POU, Lim, Paired, les doigts de zinc ainsi que l'hexapeptide (gènes *hox*) se retrouvent chez plusieurs membres des différentes familles d'homéoprotéines. En général, les membres d'une même famille ont des séquences très conservées, en particulier au niveau de l'homéodomaine. Ainsi, les différents membres d'une même famille possèdent une spécificité de liaison à l'ADN très semblable puisqu'ils possèdent le même acide aminé en position 50 de leur homéodomaine. Ainsi, la majorité des homéodomaines possèdent une glutamine en position 50 de leur homéodomaine et lient de préférence la séquence consensus TAATGG. Par contre, les homéoprotéines de la famille POU possèdent une cystéine à cette position, alors que les *paired*, ont quant à eux une sérine. D'autres homéoprotéines possèdent une

histidine (*cut*) ou une lysine (*bicoïd*) à cette position. Les homéodomaines lient en général l'ADN sous forme monomérique à l'exception des membres de la famille *paired* qui eux lient sous forme de dimère une séquence palindromique du site consensus répétée. Dans ce dernier cas, l'identité de l'acide ammié en position 50 dans l'homéodomaine (sérine) a aussi de l'importance pour la formation de dimères coopératifs; puisque son remplacement par une lysine élimine presque entièrement sa capacité de lier l'ADN sous forme dimérique (Wilson et al. 1993; Wilson et al. 1996).

Les membres de la sous-famille Pitx possèdent une lysine en position 50 de leur homéodomaine et sont donc très proches des homéoprotéines de la famille *bicoïd* pour ce qui est de leur spécificité de liaison à l'ADN. Toutefois, la structure générale de leur homéodomaine comportent plus de similarités avec les homéodomaines de la famille *paired* (à l'exception de la lysine à la place de la sérine en position 50 dans l'homéodomaine) qu'avec celui de *bicoïd*. Ainsi, les protéines à homéodomaine Pitx forment une sous-famille distincte dont seuls les membres de la sous-famille Otx sont apparentés. En effet, l'homéodomaine des membres de ces deux sous-familles sont de type *paired*, mais avec une spécificité de liaison à l'ADN caractéristique de *bicoïd* (site consensus TAATCC). Les membres des sous-familles Pitx et Otx lient l'ADN sous forme de monomère (Lamonerie et al. 1996).

1.2.2 Rôle des protéines à homéodomaine

En tant que facteurs de transcription, les homéoprotéines sont impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes. Au cours du développement, leur patron d'expression est souvent assez restreint et précis ce qui leur permet d'exercer un contrôle dans la différenciation cellulaire et tissulaire de l'organisme.

1.2.2.1 Pitx1 et 2

Le "pituitary homeobox 1", ou Pitx1, a été cloné initialement en tant que facteur de transcription spécifique à l'hypophyse participant au contrôle transcriptionnel de l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC) au sein de la lignée corticotrope (Lamonerie et al. 1996; Szeto et al. 1996). Depuis, il a été démontré que Pitx1 participait à l'activation de plusieurs autres promoteurs hypophysaires dans d'autres lignées cellulaires provenant de l'hypophyse (Tremblay et al. 1998; Szeto et al. 1996), où il est également exprimé au cours du développement de même que chez l'adulte (Lancôt et al. 1999a). Au cours du développement de la souris, son expression est détectée de façon précoce (à partir du jour E8) au niveau du stomodeum, puis de la 1^{re} arche branchiale et de leur dérivés respectifs. Pitx1 est également exprimés dans le mésoderme latéral qui formera les membres postérieurs (Lancôt et al. 1997). Son inactivation a particulièrement mis en évidence son importance pour la formation de la mandibule et des membres postérieurs (Lancôt et al. 1999b; Szeto et al. 1999).

Pitx2 a été identifié en tant que gène responsable du syndrome de Rieger chez l'humain (Semina et al. 1996). Pitx2 possède sensiblement les mêmes capacités transcriptionnelles que Pitx1 et contribue à l'activation de la transcription de plusieurs gènes encodant des hormones hypophysaires (Drouin et al. 1998; Tremblay et al. 2000). Pitx2 est en effet lui aussi détecté dans plusieurs lignées hypophysaires, à l'exception toutefois de la lignée corticotrope (Drouin et al. 1998; Gage et al. 1999a). Récemment, le rôle d'un isoforme de ce facteur (Pitx2c) dans l'établissement de l'axe gauche-droite au niveau des organes internes a été mis en évidence (Ryan et al. 1998; Yoshioka et al. 1998; Logan et al. 1998; Piedra et al. 1998; Schweickert et al. 2000), revus dans (Harvey 1998).

Les expériences effectuées avec Pitx1 et 2 ont montré que ces facteurs peuvent interagir avec plusieurs types d'activateurs transcriptionnels. Dans

ce cas, leur effet est souvent synergique, c'est-à-dire que l'activation obtenue par les deux facteurs ensemble est supérieure à l'addition des activations produites par chacun des facteurs seul. Ainsi, Pitx1 est capable d'interagir avec SF-1 (récepteur nucléaire orphelin) et Egr-1 (protéine à doigts de zinc) (Tremblay et Drouin 1999; Tremblay et al. 1999), ainsi qu'avec Pan1 (bHLH) (Poulin et al. 2000). Pitx1 est capable d'activer différents gènes-cibles de façon synergique avec ces facteurs. Les différents Pitx sont particulièrement bien conservés au niveau de l'homéodomaine. Il est donc probable que tous les membres de cette famille soient capables des mêmes interactions lorsque celles-ci se font via l'homéodomaine, comme dans le cas de l'interaction Pitx1-Pan1. Cependant, les interactions impliquant des régions à l'extérieur de l'homéodomaine ont moins de chances de se retrouver chez les autres Pitx puisque ces régions y sont nettement moins bien conservées. Néanmoins, les connaissances acquises par l'étude de Pitx1 et 2 peuvent aussi être utiles pour formuler des hypothèses quant aux mécanismes par lesquels Pitx3 participe à l'activation de la transcription de ses gènes-cibles.

1.2.2.2 Pitx3

Pitx3 a été cloné dans le cerveau grâce à son homologie avec les protéines à homéodomaine de type *paired*. Au niveau du cerveau, Pitx3 est exprimé uniquement dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale alors que son expression dans le reste de l'embryon est détectée dans plusieurs tissus (Smidt et al. 1997). Récemment, Pitx3 a été impliqué dans l'ASMD (anterior segment mesenchymal dysgenesis) ainsi que dans des cas de cataractes congénitales. (Semina et al. 1998). Chez la souris, Pitx3 a été impliqué dans la mutation Aphakia. Une mutation du promoteur de Pitx3, causant une perte d'expression drastique de son expression en serait la cause. Les souris Aphakia ont principalement des problèmes au niveau du développement de l'oeil, où Pitx3 est également exprimé (Semina et al.

2000;Semina et al. 1996). Cependant, contrairement à Pitx1 et Pitx2, Pitx3 n'est pas exprimé dans l'hypophyse et porte donc bien mal son nom. Il semble lui aussi avoir les mêmes propriétés transcriptionnelles que les deux autres Pitx, mais il est certain que ses cibles transcriptionnelles sont différentes de part son patron d'expression distinct. Afin d'évaluer le rôle possible de Pitx3 au cours du développement, il fut donc décidé d'établir de façon détaillée son patron d'expression dans l'embryon de souris. Comme pour tous les gènes ayant une implication au cours du développement, non seulement était-il important de connaître dans quelles structures ce gène était exprimé, encore fallait-il aussi savoir à quel moment. En effet, le temps a une place prépondérante lorsqu'on étudie les événements liés au développement. En effet, l'embryon subit des transformations morphologiques et fonctionnelles drastiques sur de courtes périodes de temps, au fur et à mesure que les différentes structures apparaissent et que les organes se forment. Il existe également des structures présentes transitoirement durant des périodes limitées du développement et dont les tissus ou organes qui en dérivent n'ont pas réellement de ressemblance avec les structures de départ. Deux exemples frappants sont les somites et les crêtes neurales.

1.3 Les structures transitoires de l'embryon

1.3.1 Le somite

1.3.1.1 Origine et lignage cellulaire

Les somites sont des structures segmentées qui sont formées dans l'embryon suite à une condensation du mésoderme paraxial de part et d'autre du tube neural. Les somites les plus rostraux sont formés en premier, suivis graduellement des somites plus caudaux. Ils sont ensuite rapidement compartimentés suite à leur polarisation en réponse à des signaux provenant de leur environnement. La partie ventrale du somite deviendra ainsi le sclérotome, alors que la partie dorsale

donnera lieu au dermomyotome. Les cellules du sclérotome deviennent par la suite mésenchymateuses, puis forment finalement le squelette axial: le corps des vertèbres, les arches neurales ainsi que les côtes. Le destin des cellules du dermomyotome est plus diversifié; ces cellules donneront lieu à deux lignées de cellules musculaires distinctes ainsi qu'à des cellules épithéliales. Ce sont les cellules situées dans la partie centrale du dermomyotome qui vont effectivement former le derme du dos. Les cellules de chaque extrémité du dermomyotome vont produire les deux lignées de cellules musculaires squelettiques de l'embryon. La portion la plus médiane du dermomyotome produira donc les cellules des muscles hypaxiaux, c'est-à-dire les muscles du dos, les muscles axiaux ainsi que les muscles intercostaux. Les cellules situées à l'extrémité latérale du dermomyotome produiront quant à elles les muscles épaxiaux. Ceux-ci incluent les muscles des parois abdominales et latérales de l'embryon, mais aussi les muscles des membres (muscles appendiculaires) (Currie et Ingham 1998).

1.3.1.2 Différenciation et marqueurs moléculaires

Les différents signaux impliqués dans la différenciation des somites ainsi que des marqueurs moléculaires associés aux différentes lignées qui en dérivent commencent à être connus. La polarisation des somites selon l'axe dorso-ventral implique Sonic Hedgehog (Shh) (Johnson et al. 1994; Fan et al. 1995). En son absence, les dérivés du sclérotome sont tout simplement absents (Chiang et al. 1996). Bien qu'il ne semble pas essentiel au développement du dermomyotome, Shh est tout-de-même capable d'induire Myf5, un marqueur du dermomyotome médian (Cossu et al. 1996a; Borycki et al. 1999). Les cellules du sclérotome expriment scleraxis ou Pax1, ce qui différencie les cellules qui donneront lieu au corps des vertèbres de celles qui formeront les disques intervertébraux, respectivement (Deutsch et al. 1988; Cserjesi et al. 1995). Les cellules du dermomyotome, en plus de

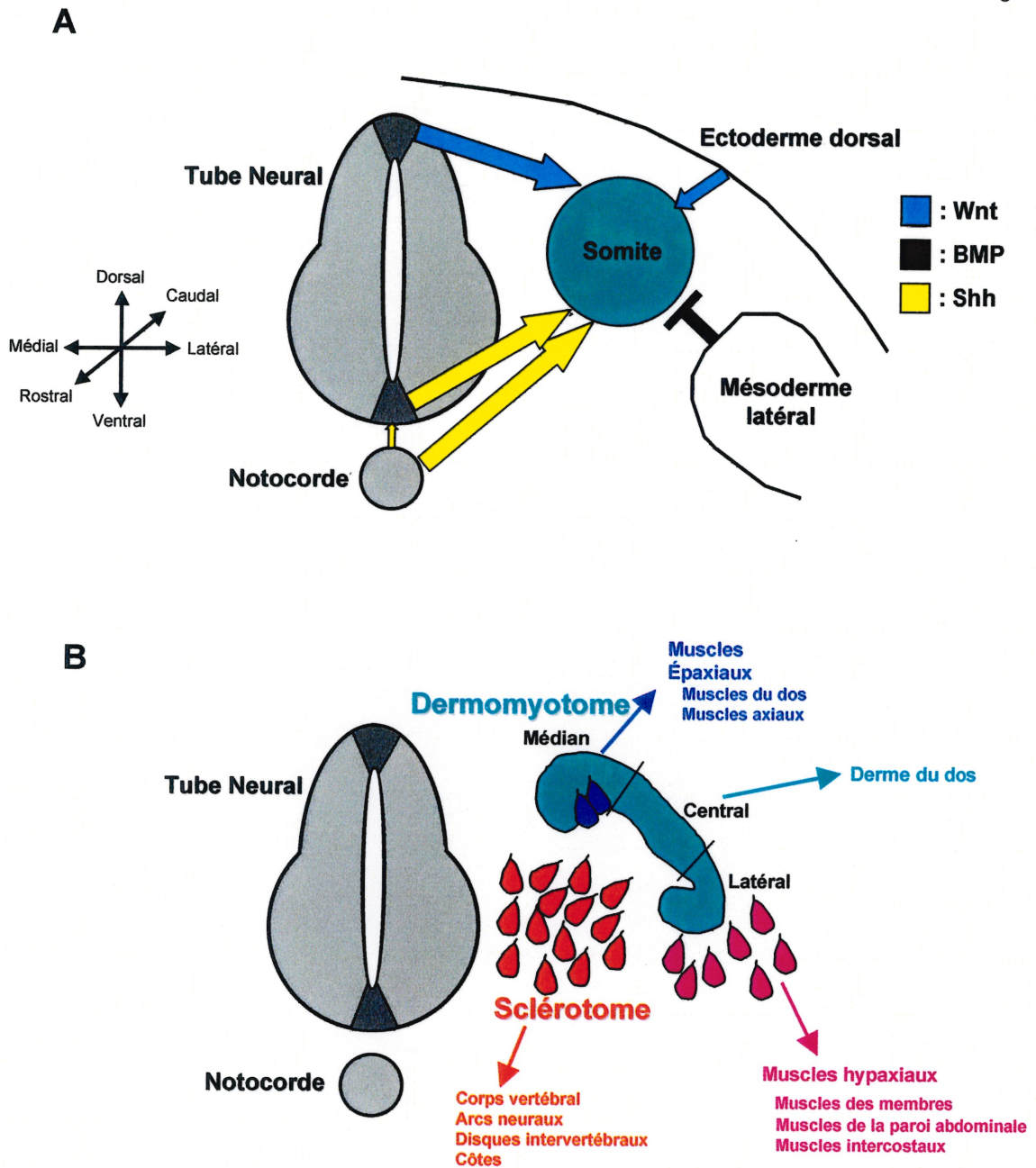


Figure 1.1 Développement des somites

A- Développement précoce des somites (E9.5 pour les somites thoraciques) et morphogènes influençant leur détermination

B- Maturation du somite et destin cellulaire de ses dérivés (E11.5 pour les somites thoraciques)

pouvoir être influencées par Shh, reçoivent des signaux Wnt (1, 3 ou 4) de la partie dorsale du tube neural (Ikeya et Takada 1998; Stern et al. 1995). Des signaux BMP4 proviennent également du tube neural dorsal, en plus des signaux originant de l'ectoderme sus-jacent que l'on soupçonne être des signaux Wnt (Wnt-11). Enfin, le mésoderme latéral produit également des signaux BMP4 qui influenceront les cellules du dermomyotome latéral. BMP4 a un effet répresseur sur la différenciation musculaire. Son effet est contrecarré par Noggin qui lui-même est induit en réponse aux signaux Shh et Wnt (Hirsinger et al. 1997; McMahon et al. 1998; Reshef et al. 1998; Marcelle et al. 1997; Tajbakhsh et Cossu 1997).

Les cellules du dermomyotome expriment Pax3 tôt durant le développement. Pax3 est également exprimé dans le tube neural lors du développement. Cependant, une surexpression importante de Pax3 dans le tube neural peut y produire des myoblastes (Maroto et al. 1997). On soupçonne en effet Pax3 d'agir différemment selon l'intensité de son expression. Il est exprimé modérément en temps normal dans le tube neural dorsal, alors que son expression est beaucoup plus importante dans le dermomyotome. Le fait que Pax3 soit exprimé fortement dans les précurseurs musculaires en migration laisse croire que ce facteur empêcherait ces cellules d'amorcer leur différenciation trop rapidement tout en participant à leur détermination musculaire. Une fois ces cellules arrivées à leur site d'implantation, elles peuvent amorcer le programme de différenciation musculaire. Celui-ci est caractérisé par l'expression successive de facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice qui induiront finalement la différenciation musculaire. Ces bHLH myogéniques sont: Myf5, MyoD, MRF4 et myogénine. Myf5 et/ou MyoD est (sont) exprimé(s) en premier lieu, suivis de MRF4 et de la myogénine. Ces facteurs sont capables d'induire un phénotype musculaire dans bon nombre de types cellulaires. Ils sont donc capables d'induire l'expression des gènes caractéristiques du

muscle: myosine, actine squelettique, etc. Les précurseurs musculaires hypaxiaux expriment en premier lieu Myf5, alors que les précurseurs épaxiaux expriment quant à eux MyoD et Sim1. Ce dernier est un autre facteur de type bHLH dont on ne connaît pas encore la fonction (Currie et Ingham 1998;Tajbakhsh et Cossu 1997;Cossu et al. 1996b;Maire et Spitz 1997).

1.3.1.3 Somitomères: muscles et ossature de la tête

Tous les muscles squelettiques du tronc et des membres dérivent des somites. Cependant, il n'y a pas de somites dans la tête, bien que celle-ci comporte de nombreux muscles squelettiques. La langue et certains muscles du cou dérivent de la corde hypoglossale, qui elle-même dérive des somites les plus rostraux. Bien que la tête ne comporte pas de somite en tant que tel, le mésoderme paraxial qui s'y trouve se condense tout-de-même de chaque côté du tube neural, mais ne se segmente pas. Ces condensations, nommées somitomères, se divisent en parties dorsale et ventrale, tout comme les somites. La partie ventrale donnera lieu à certaines structures osseuses de la tête, alors que la partie dorsale formera les muscles squelettiques de la tête. Les somitomères, contrairement aux somites, ne produisent pas de derme. Il est aussi intéressant de constater que Pax3 n'est pas exprimé dans les somitomères, ce qui ne les empêchent pas d'exprimer les bHLH myogéniques et de produire du muscle squelettique (Noden et al. 1999).

1.3.2 Les cellules des crêtes neurales

Les cellules des crêtes neurales originent des bourrelets neuraux formés aux extrémités dorsales du tube neural en cours de formation. Une fois le tube neural refermé, ces cellules vont migrer de chaque côté du tube neural pour aller former des structures très variées dans l'organisme. Il existe deux grandes voies de migration pour ces cellules. Certaines de ces cellules migreront de façon dorso-

latérale et vont donc passer du côté dorsal des somites. Ces cellules contribueront à la formation du derme du dos. La deuxième voie de migration est ventro-médiale. Dans ce cas, les cellules longent le tube neural et atteignent la partie ventrale de l'embryon. Ces cellules formeront tout le système nerveux périphérique (sensoriel, sympathétique et parasymphatique) ainsi que plusieurs autres structures discrètes (certains endothéliums, les valves cardiaques, etc.). Au niveau de la tête et du cou, les dérivés des crêtes neurales sont plus variés; une bonne partie des os de la tête et du cou sont de cette origine, ainsi que les tendons des muscles. Le cartilage du nez, les yeux, les glandes thyroïde et parathyroïde ainsi que le thymus originent également de ces cellules. Très peu de marqueurs sont connus pour les cellules des crêtes neurales et l'identité des morphogènes qui les influencent est peu connue, à l'exception de Wnt1 qui est très important pour l'expansion de ces cellules (Ikeya et al. 1997). On sait aussi que ces cellules ont une très grande plasticité au cours de leur développement ce qui suppose que les signaux qu'elles reçoivent de leur environnement sont en grande partie responsables de leur destin final. Comme ces cellules originent du tube neural et migrent près de celui-ci (voie de migration ventro-latérale) ou de l'ectoderme dorsal (voie de migration dorso-latérale) ainsi que des somites (partie dorsale ou partie médiane, selon la voie de migration utilisée), on peut supposer que des signaux provenant de ces structures influencent le destin de ces cellules au cours de leur développement précoce (Le Douarin 1982;Anderson 1997).

1.3.3 Expression de Pitx3

Avant que le patron de Pitx3 n'ait été analysé de façon extensive et que l'on se rende compte qu'il est exprimé dans le muscles squelettique et certains dérivés de crêtes neurales (1^{er} manuscrit de ce mémoire), c'est surtout son expression dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale qui a capté l'attention. En

effet, Pitx3 apparaît dans les précurseurs de ces neurones au jour E11, soit une demi-journée après Nurr1 et une demi-journée avant la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme limitante de la voie de synthèse de la dopamine (Smidt et al. 1997). C'est donc son implication potentielle au cours du développement neuronal qui a été étudiée en premier lieu.

1.4 Développement du système nerveux central

1.4.1 Origines de la diversité

La complexité du système nerveux central provient essentiellement de la diversité des cellules qui le composent. Cette diversité phénoménale a plusieurs origines au cours du développement et des mécanismes très variés en sont responsables. Au cours de l'embryogenèse, les précurseurs neuronaux vont devoir sélectionner un certain nombre d'entre eux qui deviendront réellement des cellules nerveuses et non des cellules épithéliales. Des mécanismes semblables pourraient également être impliqués lors de la sortie du cycle cellulaire, qui ne s'effectue pas en même temps pour tous les neurones et doit être réglée précisément dans le temps. Les neurones doivent aussi exprimer les molécules qui leur sont nécessaires pour leur fonction: neurotransmetteurs ou enzymes de biosynthèse ainsi que récepteurs et canaux membranaires appropriés. Enfin, les cellules neuronales produisent des axones qui devront migrer aux bons endroits afin d'atteindre les cibles appropriées.

1.4.2 Origine du système nerveux central

Le développement du système nerveux commence tout d'abord par la formation de la plaque neurale. Celle-ci se délimite dans l'ectoderme notamment grâce à des mécanismes d'inhibition latérale (Système Notch-Delta). Ensuite, cette plaque neurale s'invagine en une gouttière neurale qui finit par se refermer pour produire le tube neural. La partie la plus rostrale du tube neural se replie sur

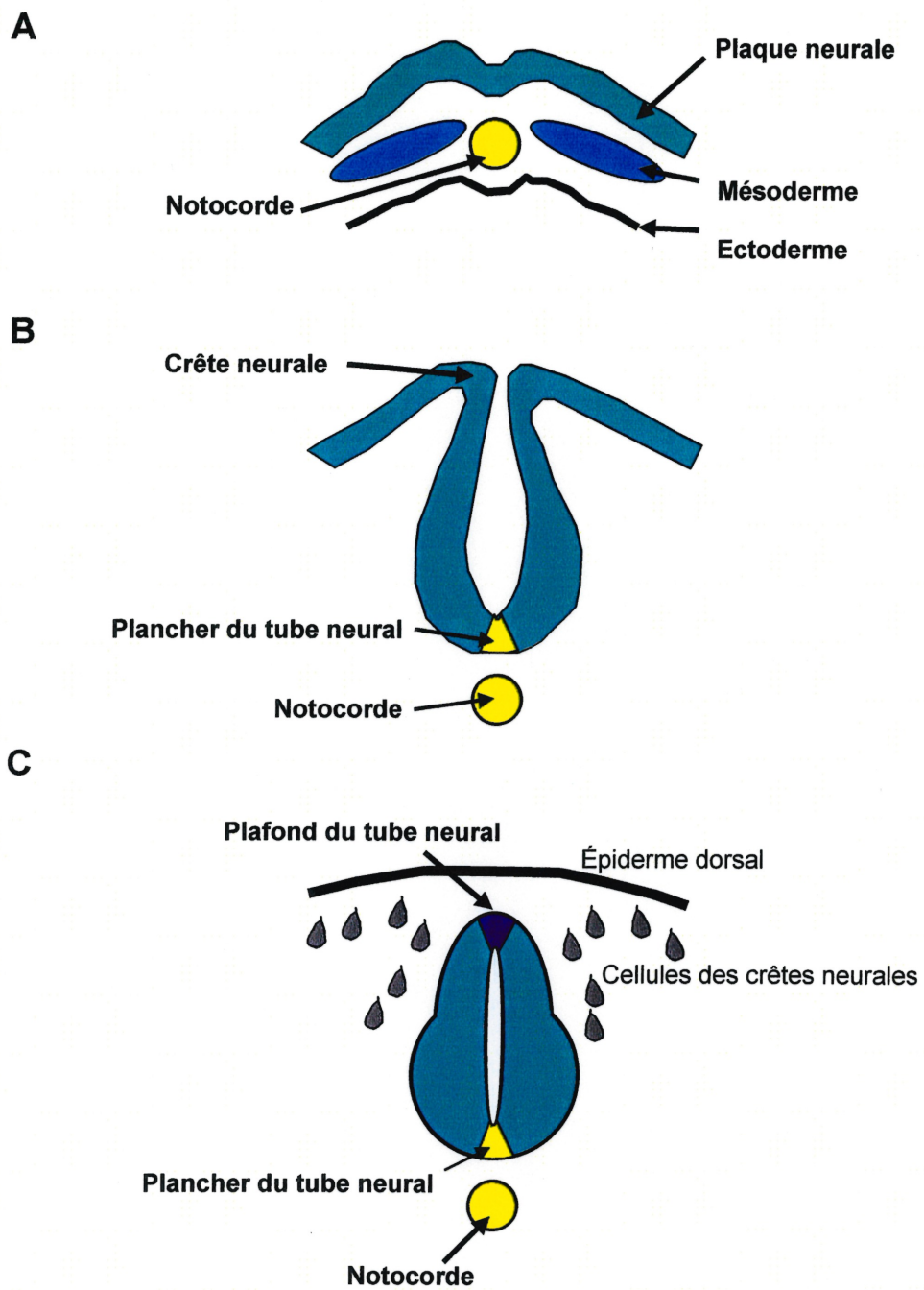


Figure 1.2 Organisation du système nerveux central au cours du développement

A- Plaque neurale

B- Gouttière neurale

C- Tube neural

elle-même de telle sorte qu'elle donne finalement lieu aux différentes structures du cerveau. Simultanément à la neurulation, la notocorde (mésoderme axial) produit des signaux qui induiront les cellules gliales du centre de la plaque neurale à former une structure appelée plancher du tube neural. Cette structure se situe en effet à l'extrémité ventrale du tube neural. Une structure semblable existe également à l'extrémité dorsale du tube neural. Ce plafond du tube neural est induit par l'ectoderme aux deux extrémités latérales de la plaque neurale pendant la neurulation. Ces deux structures (plancher et plafond du tube neural) vont par la suite produire des signaux très importants lors de la polarisation du tube neural selon l'axe dorso-ventral (section 1.4.3.2) (Hemmati-Brivanlou 2000).

1.4.3. Établissement des axes et spécification du phénotype neuronal

1.4.3.1 Axe antéro-postérieur

L'établissement de l'axe antéro-postérieur du tube neural est indissociable de la neurulation elle-même. En effet, les études effectuées chez le Xénope ont montré que deux sources de signaux distincts contribuaient à la polarisation du tube neural selon l'axe antéro-postérieur. La première source de signal est le mésoderme situé sous l'ectoderme. Celui-ci sécrète des signaux qui contribuent à spécifier la plaque neurale sus-jacente selon sa position au sein de l'axe antéro-postérieur. La deuxième source de signaux est l'organisateur de Spemann lui-même, qui sécrète des signaux caudalisant. Comme les précurseurs qui formeront les structures les plus antérieures du tube neural sont les plus éloignées de l'organisateur, ce sont également eux qui sont le moins exposés à ces signaux caudalisant (Hemmati-Brivanlou 2000).

1.4.3.1.1 Tronc et rhombencéphale

Les neurones du tronc et des rhombomères cadrent bien dans le modèle classique de la spécification des précurseurs neuronaux expliquée ci-haut. Les rhombomères, c'est-à-dire les structures qui donneront lieu au rhombencéphale, constituent un des derniers vestiges de segmentation chez les vertébrés. Les patrons d'expression dans ces structures rappellent étrangement ceux des molécules responsables de la spécification des segments de la Drosophile. Les gènes Hox sont également exprimés au niveau des rhombomères, tout comme dans le tronc sur toute sa longueur. Il est en effet connu que la combinaison des gènes exprimés à des niveaux distincts selon l'axe antéro-postérieur est différentes d'un niveau à l'autre et est responsable du "patterning" de plusieurs structures de l'embryon selon cet axe, y compris le tube neural. Les gènes Hox sont exprimés dans le mésoderme adjacent au tube neural, mais on ne connaît pas encore les mécanismes utilisés pour médier leur effet dans le tube neural (Hemmati-Brivanlou 2000;Lumsden et Krumlauf 1996;Sasai et De Robertis 1997).

Néanmoins, chez les vertébrés, le système nerveux central a évolué de telle sorte que le cerveau a pris une ampleur toujours croissante au cours de l'évolution. La spécification des précurseurs neuronaux de ces régions, du moins ce que l'on en comprend, se fait de façon passablement différente que dans les régions plus caudales.

1.4.3.1.2 Télencéphale et diencephale

La partie la plus rostrale du système nerveux central, qui inclut le télencéphale et le diencephale, a une organisation différente de celle des parties plus caudales. Deux modèles prévalent quant à la compartimentation de ces structures. L'une met en cause des séparations physiques produisant quatre

neuromères au sein du diencephale (Figdor et Stern 1993). L'autre fait plutôt appelle à l'expression restreinte de plusieurs facteurs de transcription (Nkx2.1, Nkx2.2, Dlx2, Gbx2 et Otx2) dans ces structures, ce qui mène à l'identification de six prosomères (Puelles et Rubenstein 1993; Rubenstein et al. 1994) dans le diencephale et le télencéphale. Comme la dernière hypothèse semble la plus accessible et plus facile à intégrer dans les modèles actuels, elle est la plupart du temps préférée à celle faisant appel à des barrières physiques dont on ignore tout de la nature jusqu'ici. Cependant, bien peu de données sont disponibles pour distinguer laquelle des deux hypothèses représente le mieux la réalité.

1.4.3.1.3 Mésencéphale

Le mésencéphale se retrouve entre le diencephale et le rhombencéphale. Son positionnement ainsi que celui de la partie la plus rostrale du métencéphale au sein du tube neural dérive essentiellement du positionnement de la barrière mésencéphale/métencéphale (MHB). Cette structure discrète du tube neural joue le rôle d'un véritable organisateur pour cette région. Au cours du développement, le positionnement de cette barrière se fait simultanément à la formation du tube neural lui-même. C'est la frontière entre les régions exprimant Otx2 et Gbx2, deux facteurs de transcription à homéodomaine, qui correspond à l'extrémité caudale de cet organisateur. Otx2 est exprimé dans tout le télencéphale, diencephale et mésencéphale, incluant l'organisateur (Simeone et al. 1993). L'expression de Gbx2 commence caudalement à celle de Otx2 et inclut le rhombencéphale et continue un peu plus caudalement pour inclure le troisième rhombomère (Niss et Leutz 1998). Bien que la concordance entre ces patrons d'expression et la position de l'organisateur ait depuis assez longtemps laissé présager un rôle pour Gbx2 et Otx2 dans son positionnement (von Bubnoff et al. 1996), ce n'est que récemment que cela a été démontré clairement.

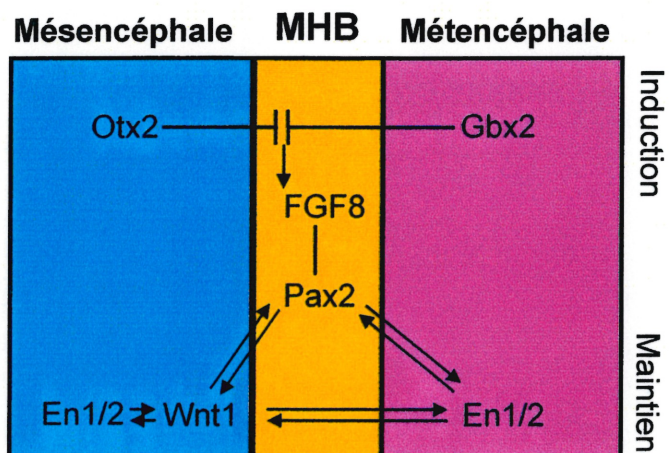


Figure 1.3 Spécification de la barrière mésencéphale-métencéphale (MHB)

D'après: Broccoli et al. (1999)

(Hidalgo-Sanchez et al. 1999;Millet et al. 1999;Broccoli et al. 1999). Par la suite, un grand nombre de gènes sont induits dans cette région afin de former l'organisateur. On voit rapidement apparaître l'expression de FGF8 et Wnt-1, qui encodent tous deux une protéine sécrétée. Viennent ensuite plusieurs facteurs de transcriptions; En1 et 2, ainsi que Pax 2 et 5 (Joyner 1996). Bien que cela constitue le modèle généralement accepté, l'ordre même d'apparition de ces facteurs est tout-de-même remis en doute (Shamim et al. 1999). Les différentes expériences d'expression ectopique ou d'inactivation de ces différents gènes ont également donné des résultats parfois déroutants. Ainsi, FGF8 exprimé ectopiquement, en plus de pouvoir à lui seul induire un mésencéphale (Crossley et al. 1996), est aussi capable de modifier en conséquence l'expression de Gbx2, d'Otx2 et des autres gènes de l'organisateur (Liu et al. 1999;Martinez et al. 1999;Lee et al. 1997a), directement ou via des intermédiaires (Adams et al. 2000). L'inactivation de FGF8 chez la souris est létale trop tôt pour que l'on puisse savoir quelles en seraient les conséquences dans le développement neural (Sun et al. 1999). Par contre, l'inactivation de Wnt-1 a montré que ce gène était essentiel au développement du mésencéphale, qui est par ailleurs complètement absent chez les souris mutantes (Thomas et Capecchi 1990;McMahon et Bradley 1990). Enfin, En1 a aussi été identifié comme cible de Wnt1 (McMahon et al. 1992;Danielian et McMahon 1996). Cependant, différentes expériences d'expression ectopiques (greffes de tissus, implantations de billes recouvertes d'inducteurs ou création de souris transgéniques) ont montré que: En1 pouvait induire FGF8 (Shamim et al. 1999), mais que FGF8 induisait En2 (Lee et al. 1997a), que Pax2 pouvait induire Pax5 (Pfeffer et al. 2000), et que Pax2/5/8 pouvaient induire En2 (Li et Joyner 2000;Song et al. 1996) et ce, bien que Gbx2 soit aussi capable d'induire FGF8 et Wnt-1 et soit essentiel à la bonne expression de ces gènes (Wassarman et al. 1997). Ce qui ressort néanmoins de l'ensemble de ces résultats

contradictoires au premier abord, c'est qu'une fois l'expression de ces gènes induite, chacun de ceux-ci consolide l'expression des autres gènes de l'organisateur.

Bien que l'on commence à avoir une idée des mécanismes de mise en place de l'organisateur, on comprend encore mal comment il influence le destin de cellules du mésencéphale et du métencéphale qui le bordent. De façon générale, on ne sait pas lesquels de ces facteurs contribuent réellement à la différenciation des populations neuronales avoisinantes. Le rôle de FGF8 dans le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale et des neurones sérotoninergiques du métencéphale constitue en ce sens une exception (section 1.4.4).

1.4.3.2 Axe Dorso-ventral

Contrairement à l'établissement de l'axe antéro-postérieur, qui est intimement lié à la neurulation elle-même, l'établissement de l'axe dorso-ventral semble presque entièrement indépendant à la fois de la neurulation, mais aussi des signaux provenant des autres axes.

1.4.3.2.1 Morphogenèse

L'origine et la nature des signaux permettant la différenciation des différents types de neurones selon l'axe dorso-ventral sont longtemps demeurés énigmatiques. On a tout d'abord constaté l'importance du mésoderme axial (notocorde) en tant qu'inducteur du plancher du tube neural (Placzek et al. 1990) (Placzek et al. 1993). Celui-ci constitue un groupe de cellules gliales à la ligne médiane ventrale du tube neural. Première constatation; la notocorde ou le plancher neural de n'importe quelle position le long du tube neural peut être interchangé(e) sans problème, ce qui montre que les signaux qui y sont produits ne contiennent aucune information positionnelle essentielle selon l'axe antéro-postérieur (Yamada et al. 1991; Simon et al. 1995). De plus, différentes

expériences de greffes ont suggéré que les signaux émanant de la notocorde et du plancher neural étaient sécrétés et qu'il s'agissait du même (ou des mêmes) molécules (Yamada et al. 1993; Yamada et al. 1991). Il a fallu un certain temps avant que l'homologue murin du gène de Drosophile Hedgehog (Hh) [nommé Sonic Hedgehog (Shh) ou Vertebrate Hedgehog (Vhh)] ne soit cloné et que l'on constate qu'il était bel et bien ce morphogène (Echelard et al. 1993; Roelink et al. 1994). En effet, la partie N-terminale sécrétée de Sonic Hedgehog est suffisante en elle-même pour induire un plancher neural et les différents neurones ventraux du tube neural (Marti et al. 1995; Porter et al. 1995). Comme on s'y attendait également, l'induction des différents types de neurones par Shh se fait selon la concentration de ce morphogène dans l'environnement des précurseurs qu'il influence (Roelink et al. 1995; Ericson et al. 1997). Ainsi, les neurones les plus ventraux sont exposés à de fortes concentrations de Shh alors que les neurones un peu plus dorsaux ont moins de Shh autour d'eux. Les précurseurs réagissent différemment selon cette concentration (bien que l'on ignore comment exactement), ce qui donne lieu à la spécification de neurones de types distincts. L'expression ectopique de composantes de la voie Shh a également produit des résultats similaires: expression ectopique de Gli1, un homologue murin de *Cubitus interruptus* (Hynes et al. 1997; Lee et al. 1997b) et de Smoothened (Smo), la composante active du récepteur de Shh. (Hynes et al. 2000). L'inactivation de Shh lui-même (Chiang et al. 1996) ainsi que celle de Gli2 (Ding et al. 1998; Matise et al. 1998) ont de façon attendue mené à une forte réduction, voir une élimination des neurones ventraux du tube neural. Certaines évidences tendent à montrer que Shh pourrait également agir via une (des) voie(s) différentes de celle impliquant les gènes Gli. Dans ce sens, certains éléments de réponse à Shh ont été identifiés dans certains promoteurs comme étant indépendants des Gli (Krishnan et al. 1997). De plus, il semble que Shh agisse *in vivo* de concert avec d'autres molécules. Jusqu'ici, la neurotrophine 3 et la vitronectine ont été

identifiées à ce titre (Dutton et al. 1999; Pons et Marti 2000). La partie N-terminale recombinante de Shh utilisée de concert avec la vitronectine est aussi efficace à induire les neurones ventraux du tube neural, alors qu'en absence de vitronectine, des concentrations de Shh plus élevées sont nécessaires pour obtenir le même résultat (Martinez-Morales et al. 1997).

Le même principe de gradients de morphogène(s) induisant différents types de neurones semble aussi s'appliquer aux neurones dorsaux. Les morphogènes qui en sont responsables appartiennent à la classe des "Bone morphogenic proteins" (BMP) et sont cette fois sécrétés par le plafond du tube neural. Quatre ont été identifiés jusqu'ici: BMP4 et 7, Dorsaline-1 et GDF7 (Liem, Jr. et al. 1995; Liem, Jr. et al. 1997; Lee et al. 1998; Lee et Jessell 1999), ce qui complique passablement les choses en comparaison avec le plancher du tube neural. On s'est longtemps demandé si les morphogènes dorsaux agissaient réellement en tant que morphogènes. Il aurait en effet été possible que les cellules du tube neural dorsal (celles exprimant ces morphogènes) deviennent elles-mêmes les neurones qu'elles "induisaient". Cette épineuse question a trouvé une réponse récemment grâce à une élégante expérience d'ablation génétique du plafond du tube neural chez l'embryon de souris. Chez ces souris, l'expression de la toxine du choléra sous le contrôle du promoteur de GDF7 a détruit spécifiquement les cellules du plafond du tube neural (où est exprimé GDF7 en temps normal). Les précurseurs neuronaux s'en sont trouvés peu ou pas affectés, mais ils ont par contre produit des neurones de type plus ventral qu'en temps normal. On a donc conclu que le plafond du tube neural agissait bel et bien lui aussi (tout comme le plancher du tube neural) comme producteur de morphogènes diffusant dans le tube neural et induisant de façon dose-dépendante les précurseurs s'y trouvant (Lee et al. 2000a).

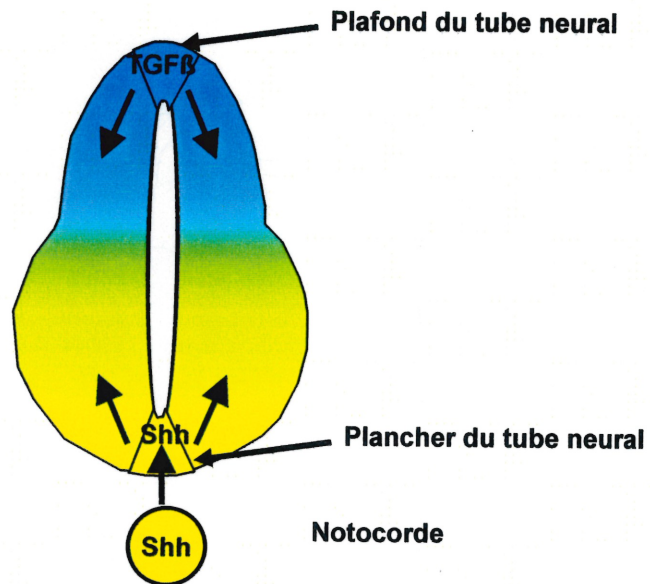
Le mécanisme général d'induction de l'axe dorso-ventral provient donc d'une polarisation du tube neural: signaux BMP provenant du plafond du tube neural versus signal Shh provenant du plancher du tube neural. Cependant, les neurones les plus médiaux ne semblent pas dépendre de ces signaux. Récemment, un troisième système d'induction a été mis en évidence. Ce système implique les rétinoïdes provenant du mésoderme axial et semble être responsable de l'induction de ces neurones en particulier (Pierani et al. 1999).

L'établissement de l'axe dorso-ventral dans le tube neural se fait donc en premier lieu via des gradients opposés de signaux provenant du plancher du tube neural (Shh) et du plafond du tube neural (BMP), en plus de certains signaux provenant du mésoderme paraxial (rétinoïdes). Ce sont les réponses différentes des cellules du tube neural en fonction des signaux reçus de leur environnement qui produira leur phénotype neuronal. L'intégration de ces signaux revêt donc une importance capitale.

1.4.3.2.2 Intégration des signaux morphogéniques

Avant même que Shh ne soit reconnu comme étant le principal signal ventralisant émanant du plancher du tube neural, on savait déjà que le plancher du tube neural produisait des signaux capables de réprimer ou d'induire des gènes en position ventrale dans le tube neural. Pax3/7 (exprimés en position dorsale) et Pax6 (exprimé en position médiane) sont de bons exemples de gènes réprimés par le plancher neural (donc par Shh) dans la partie ventrale du tube neural. Le fait que les cellules exprimant Pax3 soient plus dorsales que les cellules exprimant Pax6 au sein du tube neural s'explique par la plus grande sensibilité de Pax3 à la répression par Shh (Goulding et al. 1993; Mansouri et Gruss 1998). Il existe d'autres gènes ainsi réprimés par différentes concentrations de Shh: Pax7, Dbx1,

A



B

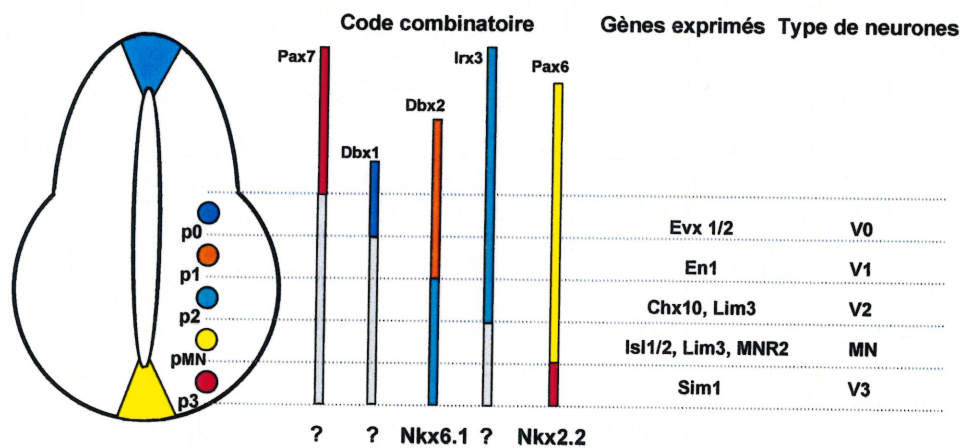


Figure 1.4 Spécification de l'axe dorso-ventral du tube neural

A- Morphogenèse - Sécrétion de Shh par le notocorde et le plancher du tube neural et de BMP par le plafond du tube neural

B- Intégration du signal dans la partie ventrale du tube neural- Le code combinatoire produit par différents gènes à homéodomaine (Nkx, Pax, Dbx et Irx) spécifie les différentes classes de progéniteurs neuronaux (p0 à p3 et pMN) dans la partie ventrale du tube neural. Ces progéniteurs se différencieront respectivement en plusieurs classes d'interneurones ventraux (V0 à V3) ainsi qu'en neurones moteurs (MN).

Dbx2 et Irx3 (Briscoe et al. 2000;Funayama et al. 1999). À l'inverse, quelques gènes sont plutôt induits par Shh à différentes concentrations, c'est-à-dire Nkx 6.1 (Qiu et al. 1998), Nkx2.2 (Price et al. 1992;Briscoe et al. 1999) et Nkx2.9 (Pabst et al. 1998). Si on tient compte du patron d'expression de ces gènes dans la partie ventrale du tube neural, on se rend compte qu'ils forment cinq zones distinctes qui correspondent exactement aux cinq groupes de progéniteurs qui s'étendent selon l'axe dorso-ventral de cette section du tube neural. Ces homéoprotéines forment donc un code combinatoire en réponse aux signaux externes. Comme ce sont tous des facteurs de transcription, donc des molécules agissant à l'intérieur de la cellule qui les exprime, on vient du même coup de passer de la détermination non-autonome des précurseurs neuronaux à leur détermination autonome. Il est intéressant de constater que les frontières d'expression de ces facteurs sont étonnamment nettes. Il a été montré, dans deux cas au moins, que le raffinement de ces frontières était causé par l'opposition d'un facteur induit par Shh adjacent à un facteur réprimé par Shh (Nkx6.6 vs Dbx2 et Nkx2.2 vs Pax6), chacun ayant un effet répressif sur l'expression de l'autre. Il est fort probable que ce type de mécanisme soit applicable pour les autres facteurs de transcription dont la frontière d'expression semble limitée par Shh, mais les protéines correspondantes induites pas Shh ne sont de toute évidence pas encore toutes connues (Briscoe et al. 2000).

Un tel code combinatoire n'est pas encore connu pour la partie dorsale du tube neural. Il semble cependant que le type de facteurs de transcription impliqués soit quelque peu différent de ceux de la partie ventrale. En effet, les facteurs de transcription de type hélice-boucle-hélice (bHLH) neurogéniques sont exprimés de façon assez uniforme dans la partie ventrale du tube neural (Tanabe et Jessell 1996). Dans la partie extrêmement dorsale du tube neural, on observe au contraire une expression limitée de plusieurs de ces facteurs (Helms et

Johnson 1998). L'expression de ces gènes pourrait produire un code combinatoire semblable à celui formé par les homéoprotéines dans le tube neural ventral (Fode et al. 2000). Malheureusement, les connaissances sur la détermination des précurseurs dorsaux sont beaucoup moins complètes que dans le cas des précurseurs ventraux.

Bien qu'on en soit arrivé à une compréhension assez substantielle des mécanismes menant à la spécification des différentes classes de neurones au sein du tube neural, il ne faudrait pas perdre de vue que l'ensemble des mécanismes menant à l'établissement du système nerveux est autrement plus complexe. Seule la détermination des précurseurs neuronaux a été abordée ici. D'autres mécanismes sont impliqués dans la formation du système nerveux. L'établissement de l'axe "centro-périphérique" dans le tube neural n'a pas été abordé ici, mais il semble qu'il ait une importance capitale au moins dans la détermination des différentes classes de neurones moteurs (Tanabe et al. 1998;Arber et al. 1999;Pfaff et al. 1996;Tsuchida et al. 1994). De plus, les mécanismes impliqués dans la migration des neurones ainsi que dans l'établissement de synapses fonctionnelles avec les cibles appropriées sont également d'une importance capitales (Tessier-Lavigne et Goodman 1996;Katz et Shatz 1996;Tear 1999). Bien que déjà assez importantes, les connaissances acquises dans ce domaine ne représentent qu'une faible proportion des mécanismes impliqués dans la création de la diversité au sein du tube neural.

1.4.4 Les neurones dopaminergiques du mésencéphale

Dans le système nerveux central, les neurones dopaminergiques du mésencéphale sont des neurones ventraux situés du côté rostral de la barrière mésencéphale-métencéphale (MHB). Ces neurones migrent en position légèrement plus dorsale une fois sortis du cycle cellulaire. C'est pourquoi ils peuvent être

considérés comme étant très ventraux au moment où ils sont influencés par le plancher du tube neural (i.e. par Shh), bien que leur position finale soit plus éloignée de cette structure (Hynes et al. 1995a). Comme leur nom l'indique, ces neurones produisent de la dopamine. Au sein du mésencéphale, ils forment la substance noire, ce qui les rend aisément identifiables. Les neurones dopaminergiques du mésencéphales innervent le striatum et ont ainsi un rôle important dans le contrôle des mouvements.

1.4.4.1 Morphogenèse

L'importance de Shh dans l'induction de ces neurones a été mise en évidence par l'inactivation chez la souris du gène encodant ce morphogène, mais aussi précédemment par des expériences effectuées sur des explants neuronaux. En effet, le traitement d'explants neuronaux prélevés dans le mésencéphale dorsal avec Shh permet l'induction de la différenciation en neurones correspondant en tous points aux neurones dopaminergiques du mésencéphale (Hynes et al. 1995b; Wang et al. 1995). C'est donc dire que Shh est responsable de l'induction de ces neurones à un endroit précis selon l'axe dorso-ventral. Selon l'axe antéro-postérieur, c'est plutôt FGF8 qui est responsable du positionnement de ces neurones. En effet, des explants de tube neural ventral prélevés en position plus antérieure peuvent produire des neurones "dopaminergiques" lorsque traités avec FGF8. Enfin, des explants à la fois plus antérieurs et plus dorsaux produisent aussi des neurones "dopaminergiques" lorsqu'exposés à la fois à Shh et FGF8 (Ye et al. 1998; Hynes et Rosenthal 1999). Ceci démontre que ces deux morphogènes sont suffisants pour l'induction des neurones dopaminergiques en position ventrale dans le mésencéphale.

Récemment, un groupe de chercheurs a réussi à obtenir des neurones "dopaminergiques" à partir de cellules souches neuronales elles-mêmes produites à partir de cellules-souches murines (ES). Encore une fois, ceci a pu être

possible en traitant ces cellules souches neuronales avec Shh et FGF8 (Lee et al. 2000b).

1.4.4.2 Développement tardif

Le développement tardif des neurones dopaminergiques du mésencéphale commence à être connu. Deux gènes ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans ce processus. Nurr1 et Pitx3 sont en effet tous les deux exprimés lors du développement tardif de ces neurones (Zetterstrom et al. 1996; Smidt et al. 1997). Un autre gène, *lmx1B*, a une expression un peu moins spécifique mais est tout de même important pour le maintien et/ou le développement de ces neurones (Smidt et al. 2000a).

1.4.4.2.1 Nurr1

Nurr1 est un récepteur nucléaire orphelin exprimé à plusieurs endroits dans le cerveau. Cependant, les neurones dopaminergiques du mésencéphale ont ceci de particulier qu'ils n'expriment que ce membre de cette famille de récepteur nucléaire (qui comprend aussi Nur77 et NOR1), rendant peu probable une redondance avec d'autres facteurs dans ces cellules (Zetterstrom et al. 1996). C'est pourquoi, on suppose, l'inactivation de Nurr1 a produit un phénotype assez spectaculaire au sein de ces neurones et nul part ailleurs (Zetterstrom et al. 1997; Saucedo-Cardenas et al. 1998; Castillo et al. 1998). En effet, les neurones dopaminergiques du mésencéphale arrêtent de migrer en absence de Nurr1 et finissent par mourir par apoptose plus tard au cours du développement (E18,5) (Wallen et al. 1999). Cependant, Pitx3 apparaît bel et bien au bon moment dans ces neurones, ce qui suggère que ces deux facteurs font partie de voies différentes et parallèles (Saucedo-Cardenas et al. 1998). Nurr1 semble avoir un rôle important dans la survie de ces neurones. Les souris ne possédant qu'une seule copie du gène

semblent en effet plus sensibles aux produits neurotoxiques que leurs consœurs possédant deux copies du gène. Il est toutefois assez difficile d'exclure la possibilité que cela soit tout simplement dû à la présence d'un moins grand nombre de neurones dopaminergiques chez les hétérozygotes avant le traitement lui-même (Le et al. 1999a; Le et al. 1999b).

Nurr1 semble nécessaire mais probablement pas suffisant pour induire la différenciation de précurseurs neuronaux en neurones dopaminergiques. Deux groupes ont jusqu'ici tenté de démontrer ce point: un utilisait une lignée de neuroblastomes qui, une fois transfectés de façon stable avec Nurr1, avaient également besoin de la présence d'astrocyte de type I provenant du mésencéphale pour pouvoir se différencier tout en acquérant un phénotype dopaminergique (Wagner et al. 1999). Une expérience semblable a aussi été menée avec des cellules souches de l'hippocampe de rat adulte. Dans ce cas-ci, aucun autre facteur n'était requis, mais le rendement était très faible et l'effet de Nurr1, minime (Sakurada et al. 1999). Ceci laisse supposer que bien que Nurr1 puisse participer au développement de ces neurones, il ne suffit pas à lui seul à en spécifier le phénotype.

Enfin, quelques groupes ont tenté de montrer que Nurr1 activait le promoteur de la tyrosine hydroxylase. Ainsi, un site identifié comme étant un site de réponse à Nurr1 (NBRE) est présent dans ce promoteur (-653 pb chez la souris). Un groupe suggère qu'il faut une région du promoteur beaucoup plus grande pour obtenir une activation par Nurr1 (Sakurada et al. 1999), alors qu'un autre groupe obtient une activation (bien que modeste) avec Nurr1 en utilisant un promoteur très court qui ne contient plus le site de liaison de Nurr1 à -653 pb (Cazorla et al. 2000). Face à ces résultats contradictoires, une meilleure caractérisation du promoteur est requise pour valider le rôle possible de Nurr1 dans l'activation de la transcription de la tyrosine hydroxylase.

1.4.4.2.2 Pitx3

Bien que le patron d'expression d'expression de Pitx3 suggère fortement une implication de celui-ci dans la différenciation finale des neurones dopaminergiques du mésencéphale, on connaît encore peu de choses sur son implication réelle dans ce système. Puisque l'expression de Pitx3 est détectée dans ces neurones après leur sortie du cycle cellulaire, il serait plus vraisemblable que Pitx3 ait un rôle dans la différenciation en tant que telle et non pas dans la prolifération des précurseurs. La seule cible transcriptionnelle identifiée jusqu'ici pour Pitx3 demeure la tyrosine hydroxylase. Pitx3 se lie avec une grande affinité au promoteur de cette enzyme de biosynthèse et il en augmente l'activité, à tout le moins en culture cellulaire (2^e manuscrit de ce mémoire).

L'inactivation de Pitx3 n'a pas encore été effectuée, mais une mutation naturelle chez la souris semble impliquer Pitx3. En effet, dans la souris *Aphakia*, une délétion dans le promoteur de Pitx3 contribue à diminuer grandement son expression dans différents tissus chez cette souris (Semina et al. 2000). Cependant, des analyses plus approfondies de ces souris seront nécessaires pour clarifier dans quelles structures l'expression de Pitx3 est perdue ou diminuée chez ces animaux, puisque les études effectuées jusqu'ici concernent essentiellement l'oeil.

Un deuxième modèle murin affectant l'expression de Pitx3 a été caractérisé récemment. Il s'agit de la souris dans laquelle le gène encodant l'homéoprotéine *lmx1b* a été inactivé.

1.4.4.2.3 Lmx1b

L'implication de Lmx1B, un facteur de transcription à homéodomaine de la famille *paired*, dans le développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale a été mise en évidence tout récemment. Une

seconde analyse du phénotype obtenu par l'inactivation de ce gène chez la souris a montré qu'il était essentiel au maintien de ces neurones au cours du développement. En effet, bien que la structure du mésencéphale soit passablement perturbée chez les souris *lmx1b* mutantes, des cellules exprimant la tyrosine hydroxylase apparaissent bel et bien au bon moment au cours du développement. Elles expriment *Nurr1* et la tyrosine hydroxylase normalement, mais cette expression disparaît un peu plus tard au cours du développement (E16) (Smidt et al. 2000b). De plus, l'expression de *Pitx3* est fortement réduite dans ces souris, ce qui suggère que *lmx1B* est essentiel à l'expression de *Pitx3* et que ce dernier n'est pas essentiel à l'apparition de la tyrosine hydroxylase dans le mésencéphale. Cependant, comme ces neurones disparaissent plus tard au cours du développement, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle *Pitx3* devient essentiel au maintien de l'expression de TH seulement un peu plus tard au cours du développement de ces neurones. Des expériences d'inactivation complète de *Pitx3* seront également nécessaires afin de clarifier la situation. En effet, l'expression de *Pitx3* est grandement réduite, mais elle n'est pas totalement abolie chez les souris dont le gène *lmx1b* a été détruit, ce qui en complique l'analyse.

Cependant, cette seconde analyse de l'inactivation du gène *lmx1b* chez la souris suggère pour la première fois une cascade plus ou moins complète d'événements reliant l'induction de ces neurones par un morphogène à l'expression de la tyrosine hydroxylase. En effet, un groupe a montré qu'au sein de la barrière mésencéphale-métencéphale, FGF8 induisait *Wnt1* via une étape où *lmx1b* était induit par FGF8 (Adams et al. 2000). De plus, *lmx1b* semble être impliqué dans l'induction de *Pitx3* par des mécanismes qui demeurent indéterminés (Smidt et al. 2000b). *Pitx3* est capable d'activer le promoteur de la tyrosine hydroxylase et pourrait ainsi être impliqué dans son expression au cours du développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Cazorla et al. 2000) et 2^e manuscrit de ce mémoire. Comme ces neurones sont spécifiés par la combinaison de FGF8 et de

Shh, il sera intéressant de savoir de quelle manière Shh participe à leur développement et à quel(s) niveau(x) ces deux voies (FGF8 et Shh) convergent.

1.4.4.3 Maladie de Parkinson et approches thérapeutiques

Les neurones dopaminergiques du mésencéphale constituent un sujet d'étude de plus en plus en vogue en raison de leur implication dans la maladie de Parkinson. On espère qu'une meilleure connaissance du développement et des mécanismes de survie de ces neurones pourra mener au développement de meilleurs traitements ou de mesures préventives efficaces pour cette maladie.

La maladie de Parkinson, avec la maladie d'Alzheimer, est au sommet du classement des maladies neurodégénératives les plus répandues à l'échelle mondiale. Plus d'un million de personnes en sont atteintes en Amérique du Nord seulement. Cette maladie est caractérisée par une perte de contrôle des facultés motrices, surtout au niveau de l'initiation des mouvements (bradikinésie). On note également une rigidité musculaire importante, qui est entre autre responsable de la stature courbée caractéristique des personnes atteintes. Le symptôme le plus classiquement associé à cette maladie demeure le tremblement continu des membres (Lang et Lozano 1998).

L'étiologie de la maladie de Parkinson n'est pas bien caractérisée. On sait tout juste qu'une destruction massive des neurones dopaminergiques du mésencéphale en est la cause, sans pour autant avoir une idée de ce qui provoque la mort de ces neurones. Plusieurs croient qu'une trop forte exposition aux stress oxydatifs pourrait avoir un rôle à jouer. À ce titre, la dopamine produite en trop grandes quantités pourrait elle-même en être responsable, bien que cela soit sujet de controverses. Des dysfonctions mitochondriales pourraient également y être impliquées. Bien que certaines formes de Parkinsonisme soient

héréditaires et que des gènes causals aient déjà été identifiés (Parkin, α -synuclein) (Kitada et al. 1998; Polymeropoulos et al. 1997; Kruger et al. 1998), la forme classique de la maladie de Parkinson est sporadique. On ne peut cependant pas rejeter entièrement l'existence de facteurs héréditaires prédisposants (Dunnett et Bjorklund 1999; Lang et Lozano 1998).

Comme pour la plupart des maladies dégénératives, les traitements existant pour la maladie de Parkinson ne font que palier tant bien que mal les pertes de fonction causées par la maladie. Le plus connu de ces traitements est l'administration de L-DOPA, un produit qui peut facilement être métabolisé en dopamine par la dernière enzyme de la voie de synthèse de la dopamine, la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC). L'AADC étant exprimée de façon beaucoup plus large que ne l'est la tyrosine hydroxylase, le L-DOPA peut aisément être converti en dopamine même si les neurones dopaminergiques du mésencéphale sont en faible nombre. Ce traitement, comme la plupart des traitements pour cette maladie, amenuise en général tous les symptômes, à l'exception des tremblements continuels des membres, contre lesquels on ne peut rien. Cependant, le traitement a ses limites et perd trop souvent de son efficacité avec le temps. Il semble malheureusement que ce soit un fait commun à pratiquement tous les traitements connus jusqu'ici (Lang et Lozano 1998; Dunnett et Bjorklund 1999; Ishida et al. 1996).

Ces dernières années, de nouveaux traitements expérimentaux ont été mis au point, mais ils sont difficilement applicables à grandes échelles. Il s'agit de la transplantation de neurones foetaux dans le cerveau des patients. Ces traitements sont aussi efficaces que les traitements au L-DOPA avec ceci en plus qu'il sont souvent plus durables, ne produisent pour ainsi dire aucun effet secondaire ni accoutumance (Ishida et al. 1996; Dunnett et Bjorklund 1999). Leur seule faille

évidente est de ne pas enrayer les tremblements des membres. Le problème avec cette technique est de toute évidence l'approvisionnement en neurones foetaux et les problèmes éthiques s'y rattachant. 6 à 10 foetus sélectionnés sont nécessaires pour chaque transplantation, ce qui est considérable compte tenu du nombre de personnes atteintes de cette maladie. Tout juste un peu plus de 300 patients ont pu bénéficier de ce genre de traitement à travers le monde au cours des 15 dernières années. Des essais de greffes xénobiotique (neurones de porcs) ont été tentés avec bon espoir, puisque les possibilités de rejet sont moins fortes dans le cerveau qu'à d'autres endroits de l'organisme (Dunnett et Bjorklund 1999). Des auto-greffes ont aussi été tentées avec succès chez les chimpanzés. Mais la possibilité de produire *in vitro* des cellules pour des fins de transplantation demeure une solution de choix (Rosenthal 1998).

Récemment, un groupe de chercheurs a réussi à mettre au point un protocole de production de neurones ayant toutes les caractéristiques des neurone dopaminergiques à partir de cellules souches murines (Lee et al. 2000b). Un point intéressant dans cette expérience est qu'elle nécessite des cellules souches embryonnaires (ES) que l'on peut maintenir et multiplier en culture. Autrement dit, la quantité de cellules produites est quasi-illimitée. Cependant, il reste encore à tester ces cellules *in vivo* afin de déterminer si elles peuvent effectivement servir à des fins de greffes neuronales chez des souris chez qui on a détruit une partie des neurones dopaminergiques du mésencéphale à l'aide de produits neurotoxiques.

Ces résultats suscitent d'autant plus d'espoirs lorsque l'on sait que des cellules souche humaines ("ES" humaines) ont été isolées récemment (Thomson et al. 1998). Bien que plusieurs questions éthiques ralentissent le travail effectué avec ces cellules, ces problèmes semblent beaucoup plus surmontables que ceux reliés à l'emploi de matériel foetal à grande échelle. Reste maintenant à savoir si les résultats obtenus avec des cellules de souris seront reproductibles avec des

cellules humaines et, évidemment, si ces cellules pourront être utilisées de façon sécuritaire pour des traitements. Si cela s'avérait faisable, on aurait un superbe exemple où la recherche fondamentale (ici, l'étude du développement neuronal) aura mené à la mise au point d'un traitement efficace contre une maladie auparavant incurable.

1.4.5 Contrôle de la distribution tissulaire des neurotransmetteurs

1.4.5.1 Généralités

L'expression correcte des neurotransmetteurs ou des enzymes responsables de leur synthèse est une étape tardive mais tout-de-même capitale du développement du système nerveux. En effet, on sait que l'expression ectopique de certaines de ces enzymes est suffisante pour influencer le phénotype neuronal de façon durable (Kobayashi et al. 1992). De plus, les neurotransmetteurs jouent tous un rôle essentiel, que ce soit à partir du développement embryonnaire (par exemple, la noradrénaline) (Zhou et al. 1995; Thomas et al. 1995) ou seulement durant la vie post-natale (dopamine) (Zhou et Palmiter 1995). Cependant, les mécanismes menant à une expression spatio-temporelle correcte dans le système nerveux demeurent mal compris. Peu de promoteurs d'enzymes de biosynthèse de neurotransmetteurs ont été étudiés jusqu'ici. Ceux qui le sont montrent en général une régulation assez complexe.

1.4.5.2 Tyrosine hydroxylase

La voie de biosynthèse de la dopamine comporte trois étapes catalysées par deux enzymes. La tyrosine hydroxylase (TH) catalyse la première réaction, alors que la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC) catalyse les deux étapes subséquentes. Contrairement à l'AADC qui est présente en quantité excessive pour les besoins de la cellule, la quantité de tyrosine hydroxylase active

dans une cellule dopaminergique est un facteur déterminant de la quantité de dopamine produite dans cette cellule. Il s'agit donc de l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse de ce neurotransmetteur, ce qui rend la régulation de cet enzyme d'autant plus essentielle.

La variété des mécanismes de contrôle de la tyrosine hydroxylase est impressionnant; à peu près tous les mécanismes (transcriptionnel, traductionnels et post-traductionnels) connus sont impliqués à un moment ou à un autre dans la régulation de cet enzyme (Kumer et Vrana 1996). Comme le but de ce projet concerne l'étude d'un facteur de transcription, ce sont uniquement les mécanismes de contrôle transcriptionnels qui seront abordés ici.

1.4.5.2.1 Études de promoteurs *in vivo*

Les expériences menées jusqu'ici dans le but de déterminer quelles étaient les portions de promoteur qui étaient requises pour obtenir une expression correcte de la tyrosine hydroxylase comprennent un nombre imposant de création de souris transgéniques. Lors de telles expériences, une portion du promoteur (dans les cas mentionnés ici, celui du rat) à étudier est cloné devant un gène rapporteur et on se sert de cette construction pour créer des souris transgéniques. On compare ensuite l'expression du gène rapporteur avec celle du gène endogène. Dans le cas de la tyrosine hydroxylase, on constate que les résultats obtenus par ce type d'expérience sont très discordants. En effet, la longueur de promoteur requise pour obtenir une expression correcte du rapporteur sans expression ectopique varie de 4.5 kb à 6 kb selon le groupe (Schimmel et al. 1999;Liu et al. 1997). D'autres affirment que des promoteurs aussi longs que 9 kb ne suffisent pas à recréer exactement l'expression endogène du gène (Min et al. 1994).

Entre ces extrêmes, on retrouve à peu près toutes les nuances (Morgan et al. 1996; Trocme et al. 1998; Banerjee et al. 1994).

Certains groupes ont effectué ce type d'expérience avec des fragments de promoteur de longueurs variées dans le but de localiser les séquences nécessaires à l'expression de TH à chacun de ses sites d'expression. En effet, il est bien connu que le contrôle transcriptionnel de la tyrosine hydroxylase, tout comme plusieurs autres gènes, comporte des différences importantes selon les différents sites d'expression du gène. Il aurait été intéressant de connaître quelles étaient les séquences importantes pour l'expression de la tyrosine hydroxylase dans le mésencéphale, mais là-dessus également, on ne parvient pas à s'entendre. Ces séquences semblent être assez proximales dans le promoteur, mais on semble avoir passablement de difficulté à les situer, puisque des fragments de promoteur de longueurs comparables (2.4 et 2.5 kb, 84 pb de différence) ont été publiés comme étant respectivement insuffisante et suffisante à l'expression correcte dans le mésencéphale (Min et al. 1994; Liu et al. 1997).

1.4.5.2.2 Études du promoteur TH en lignées cellulaires

Curieusement, la portion de promoteur requise pour avoir une activité spécifique dans des lignées cellulaires catécholaminergiques versus non-catecholaminergiques est beaucoup moins importante (moins de 1 kb) (Harrington et al. 1988). De plus, l'utilisation de différentes lignées de cellules catecholaminergiques distinctes a même produit des résultats relativement semblables. Malheureusement, les résultats obtenus en utilisant des lignées cellulaires immortalisées concordent peu avec ceux obtenus *in vivo* (en souris transgéniques). Néanmoins, ce type de modèle cellulaire a permis de définir davantage le promoteur proximal de la tyrosine hydroxylase et d'identifier plusieurs

éléments régulateurs importants s'y trouvant. Quelques nouveaux facteurs de transcription ont même été clonés de cette manière.

L'identification des facteurs impliqués dans l'activation de la transcription de la tyrosine hydroxylase s'est faite de plusieurs manières, plus ou moins simultanément. Premièrement, l'identification d'éléments du promoteur requis pour son expression correcte dans les modèles cellulaires catécholaminergiques s'est faite par délétion du promoteur et transfections dans ces cellules. Lorsqu'un élément important à l'expression spécifique ou à la réponse à un signal externe est ainsi aboli, on perd l'activité ou la réponse obtenue sur le promoteur. Les premières expériences de délétions du promoteur ont été effectuées immédiatement suite au clonage du promoteur de la tyrosine hydroxylase chez le rat. On a ainsi appris que le fragment de promoteur correspondant à -773 pb à +27 pb contenait déjà des éléments conférant une certaine spécificité cellulaire (Harrington et al. 1988). Un fragment encore plus court de promoteur (-272 pb à +27 pb) contient le(s) élément(s) de réponse à l'AMP cyclique, déjà connu auparavant comme régulateur positif de la tyrosine hydroxylase au niveau de sa transcription. Par contre, le promoteur de -773 pb ne semble pas suffisant à conférer la réponse aux glucocorticoïdes qui pourtant peuvent eux aussi stimuler la transcription de la tyrosine hydroxylase dans des cellules catécholaminergiques (Lewis et al. 1987). Bien que l'étude de l'effet des glucocorticoïdes sur TH semble avoir été abandonnée, il en est tout autrement de l'AMP cyclique. On a en effet vite identifié un CRE (cyclic AMP response element) actif au sein du promoteur TH (Fader et Lewis 1990) et constater que celui-ci était essentiel non seulement pour la réponse à l'AMP cyclique, mais aussi pour l'activité basale du promoteur (Kim et al. 1993). Ceci s'est avéré vrai dans des lignées cellulaires dérivées du système catécholaminergique périphérique (par exemple, dans les cellules PC12), mais aussi dans des lignées cellulaires dérivées du système nerveux central (cellules CATH) (Lazaroff et al. 1995). La position du CRE au sein

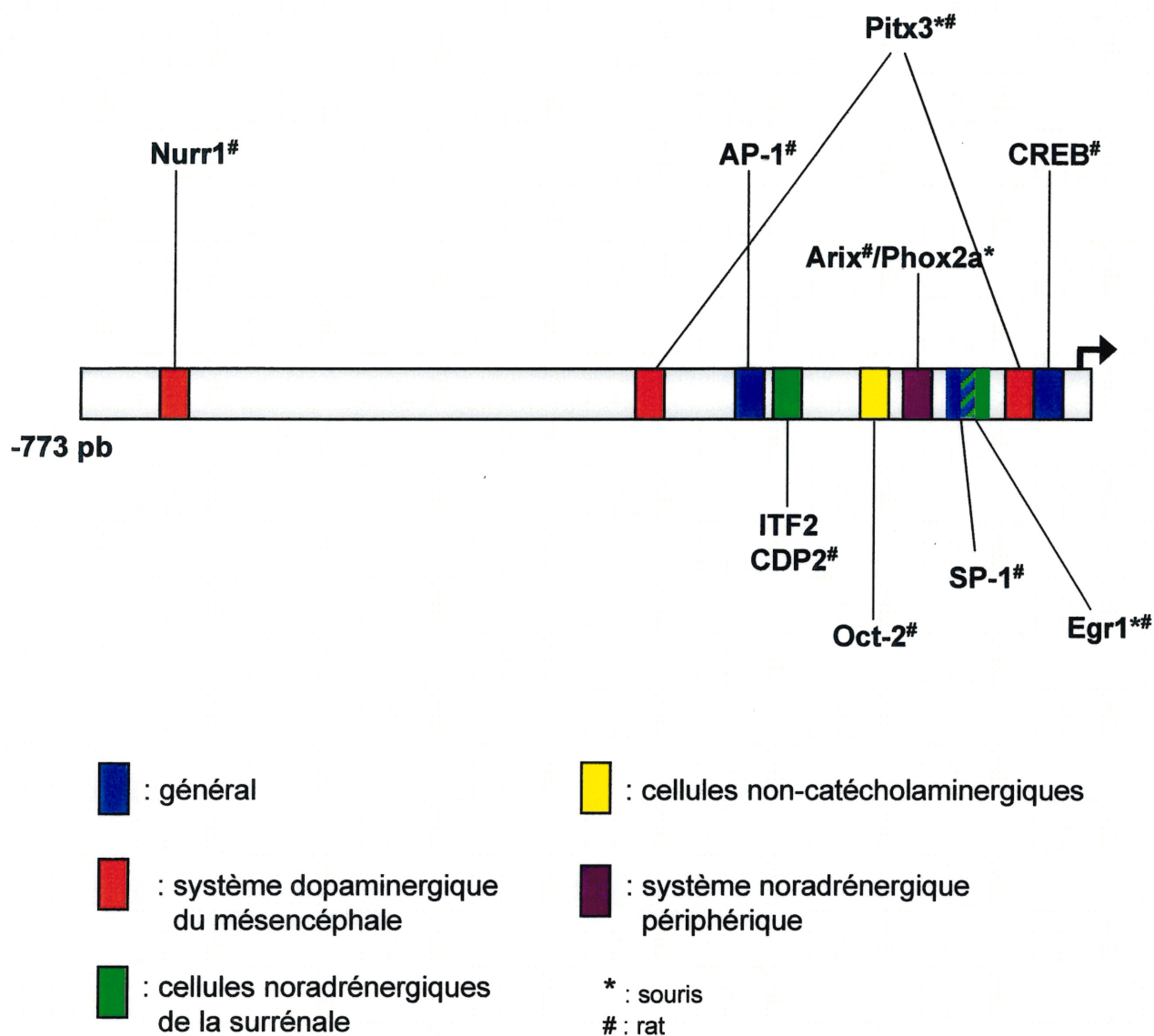


Figure 1.5 Organisation du promoteur de la tyrosine hydroxylase
 Représentation schématique du promoteur proximal de la tyrosine hydroxylase chez les rongeurs. Les facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'activité de ce promoteur et l'emplacement respectif de leur site de liaison sont indiqués. La couleur de la boîte représentant l'élément de liaison de chaque facteur de transcription réfère au système dans lequel il est le plus susceptible de moduler l'expression de la tyrosine hydroxylase, tel qu'indiqué par la légende.

du promoteur TH n'est pas tellement capitale, en autant qu'elle demeure relativement proximale (Tinti et al. 1997). Bien que l'importance du CRE ait été reconnue assez tôt, il a fallu un certain temps avant que l'on puisse montrer une liaison de facteurs de transcription sur cet élément. Le principal demeure CREB (CRE binding protein), mais des répresseurs de la même famille peuvent aussi lier cet élément (Tinti et al. 1996). La contribution de cet élément de régulation est réellement importante pour l'activité du promoteur. Bien que les séquences de régulation de ce promoteur varient assez aisément d'une espèce à l'autre (Gandelman et al. 1990), le CRE est conservé entre le promoteur de caille et celui de rat (Fauquet et Boni 1993). Pourtant, la faible similitude du promoteur TH entre des espèces peu apparentées (la caille et le rat, par exemple) ne permet pas d'en tirer un alignement de séquence sur plus de quelques dizaines de paires de bases en file.

Plusieurs éléments du promoteur de la tyrosine hydroxylase ont également été identifiés en bloc principalement parce qu'ils sont situés très près les uns des autres dans le promoteur de la tyrosine hydroxylase chez le rat et la souris. En effet, un groupe de chercheurs a montré l'importance de la région du promoteur située entre -229 et -160 pb dans l'activité spécifique de ce promoteur, et ce, de façon indépendante du CRE. Cette région contient des éléments AP-1, AP-2, POU et boîte E (Fung et al. 1992). L'élément AP-2 ne semble pas avoir été étudié plus en profondeur. Bien que ces éléments aient été au départ identifiés comme étant indépendant de l'élément CRE, il semblerait que ce site ainsi que le site AP-1 soient tous les deux impliqués dans une même réponse, celle survenant suite à un influx calcique (Nagamoto-Combs et al. 1997). Le site AP-1 coopère également avec la boîte E du promoteur et cette coopération est synergique. (Yoon et Chikaraishi 1992). L'identité du facteur de transcription de type hélice-boucle-hélice (bHLH) liant cette boîte E a été déterminé; il s'agit de ITF2, un facteur de

transcription ubiquitaire. Cependant, un autre facteur de transcription a été identifié lors de la même expérience. CDP2, une homéoprotéine apparentée à *cut* (Drosophile) a été cloné de cette manière et les deux facteurs (ITF2 et CDP2) sont requis pour activer le promoteur TH (Yoon et Chikaraishi 1994). Un facteur de la famille POU, Oct-2, réprime l'activité du promoteur TH via une liaison à l'heptamère du promoteur, déjà identifié auparavant en tant que site POU (Dawson et al. 1994).

Plus récemment, Egr1 a été impliqué dans la transcription de la tyrosine hydroxylase dans la médulla surrénale en réponse au stress. En effet, chez les rats stressés, on constate une diminution de la liaison de SP1-1 au promoteur de la TH ainsi qu'une augmentation de la liaison de Egr1, ces deux facteurs ayant des sites se chevauchant en partie (Papanikolaou et Sabban 1999). Cette augmentation de liaison a ensuite été corrélée par la démonstration de la faculté d'Egr1 à activer, bien que modestement, le promoteur TH en culture cellulaire (Papanikolaou et Sabban 2000).

Arix est un facteur de transcription qui a été cloné en tant qu'activateur potentiel du promoteur de la dopamine β -hydroxylase dans le système noradrénergique. Cependant, il a vite été montré que ce facteur de transcription à homéodomaine liait et activait aussi le promoteur de la tyrosine hydroxylase (Zellmer et al. 1995). Arix active ces deux promoteurs de façon synergistique avec l'AMP cyclique (Swanson et al. 1997).

Les cellules catécholaminergiques répondent également à EGF en augmentant le taux de transcription de la tyrosine hydroxylase. Cette réponse est attribuable à des séquences du promoteur situées entre -272 pb et +27pb. (Lewis et Chikaraishi 1987). Cet effet semble provenir de l'occupation de

l'élément AP-1 du promoteur par Fos, ce qui a pour effet de réprimer la transcription du gène (Gizang-Ginsberg et Ziff 1994).

L'état des connaissances actuelle en matière de régulation transcriptionnelle permet de bâtir des hypothèses quant aux molécules qui agiront sur certains éléments de promoteur sans avoir nécessairement recours aux expériences de délétions de promoteur ou de protection à la DNase. Ainsi, Nurr1 et Pitx3 ont au départ été soupçonnés de pouvoir activer ce promoteur simplement parce que leur patron d'expression concordait avec celui de la tyrosine hydroxylase et que un ou des sites de liaison potentiels pour ces facteurs se retrouvent dans ce promoteur. Bien que les résultats publiés concernant l'activation du promoteur de la tyrosine hydroxylase par Nurr1 ne soient pas réellement concordants, on sait que Pitx3 est capable d'activer ce promoteur, même si son site de est sujet de discussions (Cazorla et al. 2000) et 2^e manuscrit de ce mémoire.

Bien que certains sites du promoteur de la tyrosine hydroxylase semblent suggérer l'implication de facteurs de transcription additionnels dans la régulation de sa transcription, ces sites demeurent toujours énigmatiques. Ces sites ont été identifiés par protection à la DNase, mais les facteurs de transcription s'y liant sont toujours inconnus (Yang et al. 1998). De plus, certaines expériences de délétions du promoteur ont montré que des éléments plus distaux (-773 pb et plus) étaient également requis pour obtenir une activité spécifique dans certaines lignées catécholaminergiques (Wong et al. 1994). La quantité de sites identifiés au sein du promoteur de la TH peut sembler énorme, mais elle demeure tout-à-fait raisonnable si on considère que la tyrosine hydroxylase est exprimé à de multiples sites dans le système nerveux et que le contrôle de sa transcription comporte des variations parfois importantes entre ces différents sites (Kumer et Vrana 1996). Ces variations

sont d'autant plus flagrantes lorsque l'on compare la régulation transcriptionnelle de TH dans deux systèmes catécholaminergiques différents (système dopaminergique du mésencéphale avec système adrénérgique périphérique, par exemple). De plus, plusieurs des activateurs identifiés ne sont exprimés que dans certaines parties du système catécholaminergique.

Comme on peut le voir, les régulateurs transcriptionnels de la TH sont très variés. Bien qu'ils aient été caractérisés souvent de façon isolée, on commence à mettre en évidence des interactions transcriptionnelles entre eux. Le meilleur exemple à ce jour demeure l'activation synergique du promoteur TH par Arix et CREB. Une interaction physique a par ailleurs été caractérisée récemment entre ces deux protéines dans le contexte du promoteur de la DBH, où une synergie transcriptionnelle existe également entre ces deux facteurs (Swanson et al. 2000). Il n'est pas du tout surprenant de constater que plusieurs mécanismes transcriptionnels contribuent à la fois à la transcription de la TH et de la DBH. Évidemment, une telle situation est avantageuse dans les systèmes noradrénérgiques et adrénérgiques où ces deux enzymes sont exprimées et impliquées dans la biosynthèse de neurotransmetteurs. En plus de Arix et de CREB, AP-1 est un autre exemple de facteurs transcriptionnel impliqué dans la modulation de l'activité des deux promoteurs (Swanson et al. 1998).

Malgré le fait que le promoteur de la tyrosine hydroxylase soit l'un des promoteurs d'enzyme de biosynthèse les plus étudiés et qu'une quantité importante de facteurs de transcription s'y liant soient maintenant connus, il demeure tout-de-même encore mal compris. En effet, si on considère chacun des sites d'expression de la tyrosine hydroxylase individuellement, on constate que les connaissances que l'on a de la régulation de ce promoteur à chacun

de ces endroits sont bien minimales. Cependant, ce promoteur est l'un des seuls connus où l'on commence à pouvoir faire un lien continu entre les morphogènes responsables de la détermination de ces neurones jusqu'à la régulation transcriptionnelle des gènes nécessaires à la production de neurotransmetteurs.

DESCRIPTION DU PROJET

Le travail effectué dans le cadre de ce mémoire peut être divisé en deux parties distinctes. La première a consisté à compléter l'analyse du patron d'expression de Pitx3 dans l'embryon de souris. Celui-ci avait été décrit de façon incomplète et même incorrecte dans la littérature. Une analyse approfondie de résultats d'expériences d'hybridation *in situ* obtenus auparavant au laboratoire a permis de poser l'hypothèse selon laquelle Pitx3 serait exprimé non seulement dans le mésencéphale, l'oeil et le cartilage du nez, mais aussi dans la majorité des muscles squelettiques de la souris en développement. Des analyses complémentaires, incluant des comparaisons avec le patron d'expression de MyoD, ont permis de confirmer cette hypothèse.

Néanmoins, l'expression de Pitx3 dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale avait déjà été caractérisée. Pitx3 apparaît dans ces neurones une demi-journée avant la tyrosine hydroxylase, ce qui laissait envisager un rôle pour Pitx3 dans le contrôle transcriptionnel de l'expression de cette enzyme. L'objectif principal de mon travail a donc été de vérifier si Pitx3 était capable d'activer le promoteur de la tyrosine hydroxylase. Des essais de transfections transitoires dans des lignées de cellules en culture ont été effectués à cette fin. L'activation observée a été caractérisée plus à fond en identifiant un site de liaison de haute affinité pour Pitx3 dans le promoteur de la tyrosine hydroxylase. Nous avons donc conclu que Pitx3 activait le promoteur de la tyrosine hydroxylase de façon directe.

Mon projet a donc consisté à approfondir l'analyse du patron d'expression de Pitx3 dans l'embryon de souris et à identifier une cible transcriptionnelle pour ce facteur de transcription.

CHAPITRE 2

ARTICLE

**SPECIFIC EXPRESSION OF PITX3 THROUGHOUT SKELETAL MUSCLE
DEVELOPMENT**

Mélanie Lebel, Christian Lanctôt, Alain Moreau, Jacques Drouin*

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

RÉSUMÉ

Ce court papier vise à faire le point sur le patron d'expression de Pitx3 dans l'embryon de souris. La technique d'hybridation *in situ* a été utilisée afin de détecter spécifiquement les ARN messagers encodant Pitx3. Comme on le savait déjà, Pitx3 est exprimé dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale et dans l'oeil. Ce travail montre également que Pitx3 est présent dans le cartilage du nez ainsi que dans tous les muscles squelettiques de l'embryon. Il apparaît dans les dérivés du dermomyotome au jour E11.5 et dans les mêmes structures que MyoD. Il est ensuite exprimé aussi bien dans les muscles squelettiques hypaxiaux qu'épaxiaux ainsi que dans les muscles de la tête. Son expression y est maintenue jusqu'au jour E16.5 au moins. Ceci fait de Pitx3 un bon marqueur de muscle squelettique chez la souris et cadre bien avec la récente caractérisation par d'autres membres de notre laboratoire d'une interaction transcriptionnelle entre MyoD et Pitx1/3 dans le contexte du promoteur de l'actine squelettique.

ABSTRACT

The Pitx1 and Pitx2 homeodomain transcription factors have been implicated both in cranio-facial development and in hindlimbs specification and left-right lateralization, respectively. The third member of this *paired* subfamily, Pitx3, was characterized for its expression in midbrain dopaminergic neurons and in the eye. However, its expression in the trunk has not yet received much attention. We now show that it is expressed in all skeletal muscles with an onset that follows Myf5 and roughly corresponds to that of MyoD.

INTRODUCTION, RESULTS AND DISCUSSION

The Pitx3 gene was initially cloned from rat brain and early analyses of its pattern of expression indicated that it differs entirely from that of Pitx1 and Pitx2 [reviewed in (Gage and al. 1999;Drouin 1999)]. In particular, it is expressed in midbrain dopaminergic (MesDA) neurons (Smidt and al. 1997) and in the eye. Furthermore, Pitx3 mutation were implicated in anterior segment mesenchymal dysgenesis (ASMD) and congenital cataracts (Semina and al. 1998). The aphakia mouse mutation which affects the eye was defined as a Pitx3 promoter deletion, which reduces Pitx3 expression (Semina and al. 2000). Pitx3 expression pattern outside brain and eyes is still poorly defined. We now show that Pitx3 is specifically expressed in skeletal muscles, but not in smooth or cardiac muscles from embryonic day 11.5 (E11.5) in mice.

Pitx3 expression was defined by *in situ* hybridization to mouse embryo sections. In the head, Pitx3 was detected in MesDA neurons (Fig. 1A, B) and in eye (Fig. 1C, D). The expression of Pitx3 in the lens (Fig. 1C, D) differs from that of Pitx2 in eyelid and perioptic mesenchyme (Lu and al. 1999). Pitx3 mRNA was also detected in head and neck muscles, including the tongue, as well as in nasal process (Fig. 1A, B). This head muscle expression led us to investigate Pitx3 expression in trunk muscles. In addition to cranio-facial muscles (Fig. 2A, B), we observed Pitx3 hybridization in limb (Fig. 2A, B), axial and intercostal (Fig. 2C) skeletal muscles. In contrast, Pitx3 did not appear to be expressed in gut smooth muscles or in cardiac

muscle (Fig. 2C). This expression contrasts with the Pitx2 expression in heart (Gage and al. 1999;Harvey 1998). The only skeletal muscles in which Pitx3 was not detected are the muscles of the tip of the tongue, where Pitx1 is present (Lanctôt and al. 1997). The tongue appears to be a mix of muscle precursors originating from the first to fourth branchial arches (Kaufman and Bard 1999). Thus, Pitx1 expression in the tongue tip may correlate with its first arch expression (Lanctôt and al. 1997) whereas Pitx3 expression in the more proximal tongue muscles may reflect its later onset of expression. Trunk muscle expression of Pitx1 is restricted to posterior structures like hindlimbs and it starts later than Pitx3 (Lanctôt and al. 1997).

In order to determine the timing of Pitx3 mRNA appearance during skeletal muscle development, we performed comparative *in situ* hybridizations with Pitx3 and Myf5 cRNA probes. Myf5 is the earliest myogenic bHLH factor to be expressed in the dorsal part of somites which later gives rise to the dermomyotome; its expression is detected from day E8 in early somites but is reduced as MyoD expression starts (Ott and al. 1991;Rudnicki and al. 1992). In sections of E10.5 embryos, Myf5 mRNA was detected in dermomyotome while Pitx3 was not (Fig. 3B and A, respectively). Pitx3 mRNA was first detected in dermomyotome at E11.5 (Fig. 3C). MyoD is expressed in the dermomyotome from around day E10.5 and concomitantly with a decrease of Myf5 expression (Sassoon and al. 1989). In E11.5 embryos, Pitx3 and MyoD were co-expressed in the dermomyotome (Fig. 3D and E). Thus, the onset of Pitx3 expression in dermomyotome is later than Myf5 and follows with that of MyoD.

In order to further establish this correlation in various skeletal muscles, additional comparative *in situ* hybridizations were performed with Pitx3 and MyoD cRNA probes on E15.5 embryo sections. Using transverse consecutive sections, we observed a striking co-localization of Pitx3 and MyoD mRNA in all muscles of hindlimbs, tail, body wall and axial muscle. (Fig. 4).

In summary, Pitx3 mRNA appears to be expressed in all skeletal muscles of the mouse, with the exception of some tongue muscles. Skeletal trunk and limb muscles originate from somites while face and neck muscles mostly derive from paraxial mesoderm of the head. This paraxial mesoderm forms a continuous mass of cells (termed somitomere) on each side of the neural tube instead of well-defined segmented structure like somites. Somitomeres produce bone and muscle precursors like somites, but Pax3 is not expressed in somitomeres while Myf5 and MyoD are (Noden and al. 1999). Since Pitx3 is expressed as well in skeletal muscles whether of somite or somitomere origin, it should be considered as a general marker of skeletal muscles rather than of somites derivatives only. The coordinate co-localization of Pitx3 and MyoD in skeletal muscles is suggestive of a joint role in control of muscle specific gene expression and, indeed, our group has recently shown specific physical interactions between Pitx and bHLH transcription factors (Poulin and al. 2000) and also transcriptional interactions for muscle-specific expression (Poulin G. and al., in preparation).

MATERIALS AND METHODS

1.1 *Mouse strains and embryos*

CBAxC57BL6 were mated, and the morning when a vaginal plug was detected was considered as embryonic day (E) 0.5. Pregnant mice were killed and embryos were dissected, fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were mounted on aminopropyle-thioxysilane-treated slides.

1.2 *In situ hybridization*

The cRNA Pitx3 probe was synthesized using a *BamHI/PstI* fragment containing base pairs 799-971 of the Pitx3 cDNA (Smidt and al. 1997). In contrast to other hybridizations that were performed with 5' or 3' Pitx3 probes, the probe used for the experiments presented in this paper contained the homeodomain, and there is weak cross-reactivity with other members of the Pitx family in some structures, e.g., the pituitary. The cRNA MyoD probe was synthesized as described previously (Sassoon and al. 1989). The full-length Myf5 cDNA was used to synthesize the corresponding cRNA probe.

In situ hybridizations were performed as previously described (Smidt and al. 1997). Slides were dipped in K.5 autoradiographic emulsion (Ilford or Kodak NTB2) exposed for 14-30 days, developed with Kodak D-19 and counterstained with hematoxylin-eosin.

ACKNOWLEDGMENTS

We want to thank Frédérique Souazé and Michel Chamberland for their great help with *in situ* hybridization and Alexandre Marcil for the generous gift of embryo sections. We also thank Lise Laroche for expert secretarial assistance. This work was funded by the Parkinson Foundation of Canada and by Glaxo Wellcome/Medical Research Council of Canada /PMAC research chair. C.L. was a Research Student of the National Cancer Institute of Canada. M.L. is the recipient of a master's research scholarship from FCAR-FRSQ.

REFERENCES

- Drouin J. (1999) Gènes sélecteurs, identité des membres et latéralité chez les vertébrés. *médecine/sciences* **16**.
- Gage P. J., Suh H., and Camper S. A. (1999) The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mam Genome* **10**, 197-200.
- Harvey R. P. (1998) Links in the left/right axial pathway. *Cell* **94**, 273-276.
- Kaufman M. H. and Bard J. B. L. (1999) *The Anatomical Basis of Mouse Development*, pp. 1-291. Academic Press, San Diego.
- Lanctôt C., Lamolet B., and Drouin J. (1997) The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817.
- Lu M. F., Pressman C., Dyer R., Johnson R. L., and Martin J. F. (1999) Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* **401**, 276-278.
- Noden D. M., Marcucio R., Borycki A. G., and Emerson C. P., Jr. (1999) Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev Dynamics* **216**, 96-112.
- Ott M. O., Bober E., Lyons G., Arnold H., and Buckingham M. (1991) Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **111**, 1097-1107.
- Poulin G., Lebel M., Chamberland M., Paradis F. W., and Drouin J. (2000) Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* **20**, 4826-4837.
- Rudnicki M. A., Braun T., Hinuma S., and Jaenisch R. (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**, 383-390.
- Sassoon D., Lyons G. E., Wright W. E., Lin V., Lassar A., Weintraub H., and Buckingham M. (1989) Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* **341**, 303-307.
- Semina E. V., Ferrell R. E., Mintz-Hittner H. A., Bitoun P., Alward W. L. M., Reiter R. S., Funkhauser C., Daack-Hirsch S., and Murray J. C. (1998) A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nature Genetics* **19**, 167-170.

Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., and Hrstka, R. F. Graw J. (2000) Deletion in the promoter region and altered expression of pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Human Molecular Genetics* **9**, 1575-1585.

Smidt M., van Schaick H. S. A., Lanctôt C., Tremblay J. J., Cox J. J., van der Kleij A. A. M., Wolterink G., Drouin J., and Burbach P. H. (1997) A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13305-13310.

Tremblay J. J., Lanctôt C., and Drouin J. (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene *Lim3/Lhx3*. *Mol Endocrinol* **12**, 428-441.

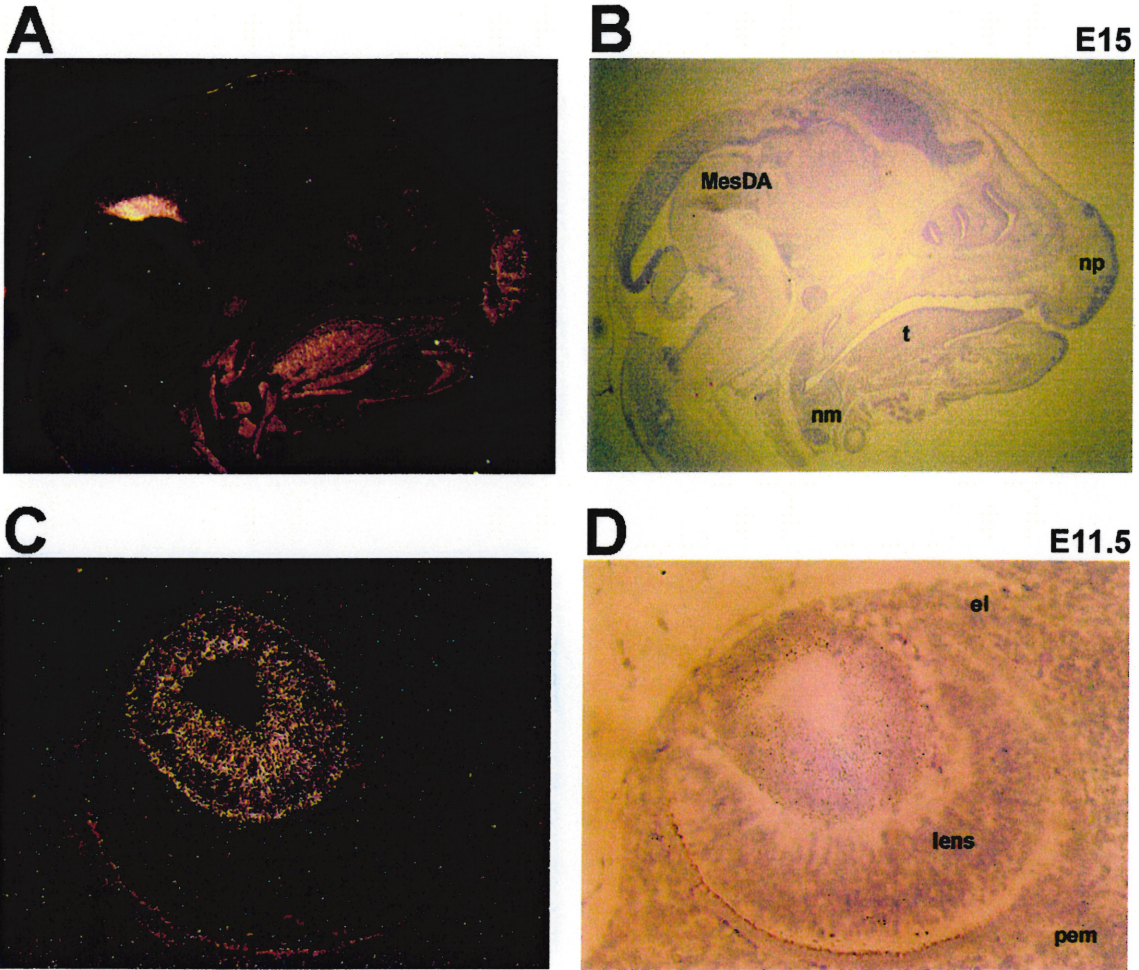


Figure 2.1. Pitx3 expression in head

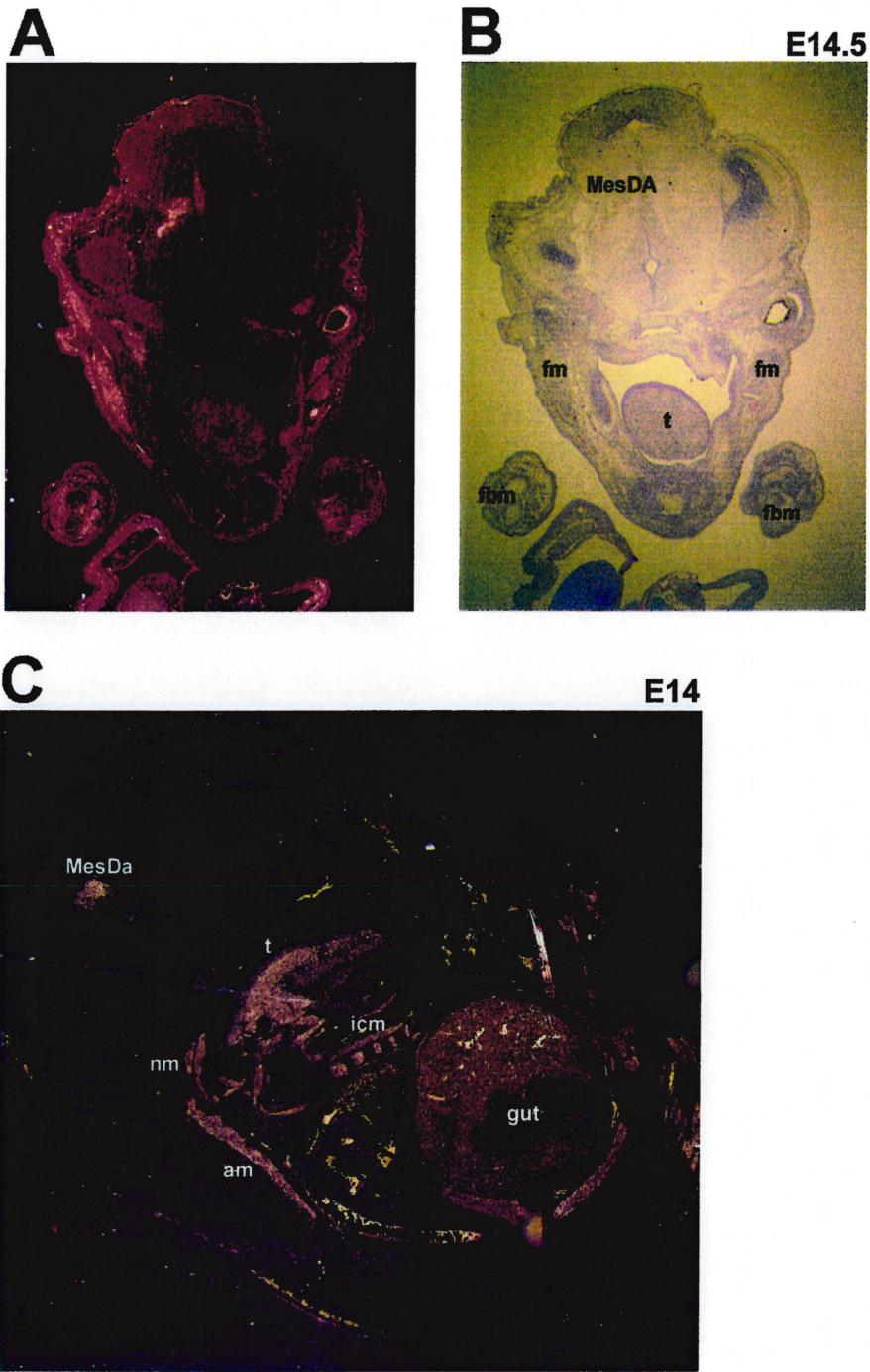


Figure 2.2. Skeletal muscles express Pitx3 during development

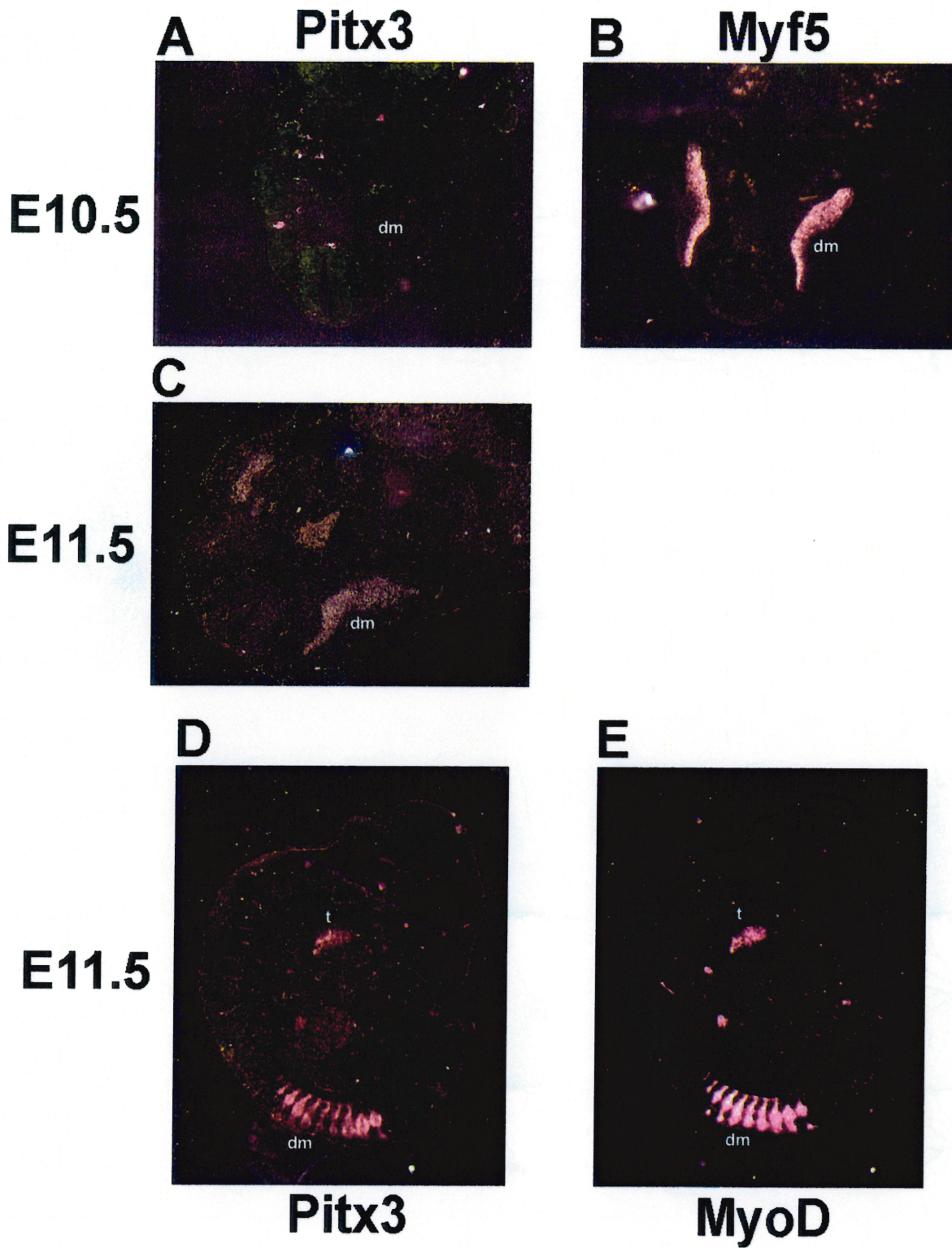


Figure 2.3. Dermomyotome expression of Pitx3 follows Myf5 and is concurrent with MyoD

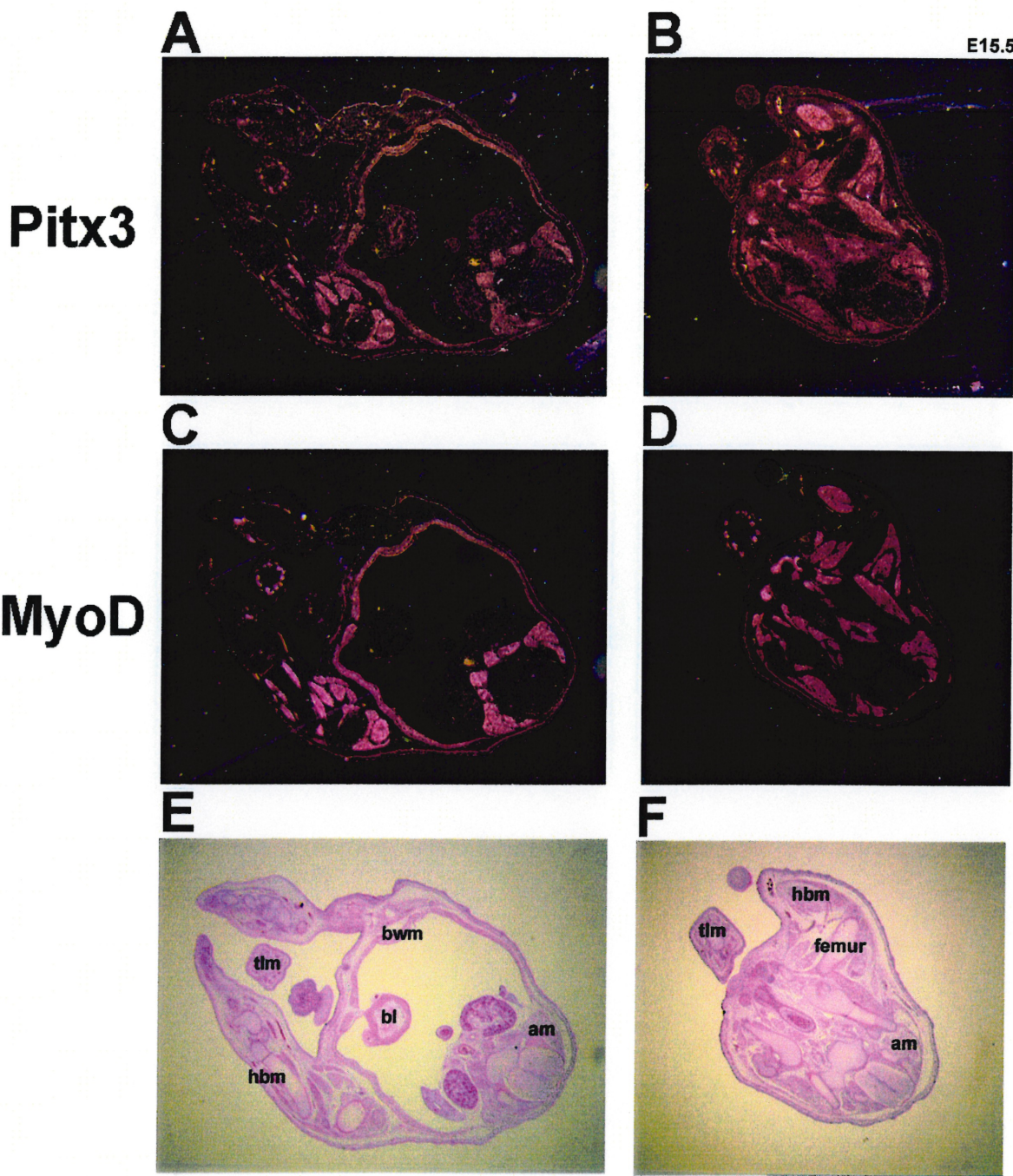


Figure 2.4. Co-localization of Pitx3 and MyoD in skeletal muscles

FIGURE LEGENDS

Figure 2.1. Pitx3 expression in head

A (dark field), **B** (bright field)- *In situ* hybridization performed on sagittal section of day E15 mouse embryo. Pitx3 mRNA is detected in MesDA neurons, nasal process (np), tongue (t) and neck muscles (nm). Signal in pituitary (and probably olfactory epithelium) is likely to be cross-hybridation with Pitx1 or 2 since there is no Pitx3 mRNA in this tissue (Tremblay and al. 1998).

C (dark field), **D** (bright field)- *In situ* hybridization performed on frontal section of day E11.5 mouse embryo showing strong Pitx3 expression in the eye lens. In contrast, Pitx2 is expressed in periocular mesenchyme (pem) and in eyelid mesenchyme (el) (Lu and al. 1999)

Figure 2.2. Skeletal muscles express Pitx3 during development

A, (dark field), **B** (bright field)- *In situ* hybridization performed on frontal section of day E14.5 mouse embryo showing Pitx3 expression in facial (fm) and forelimb (fbm) muscles. Pitx3-positive MesDA neurons are visible on one side of the brain.

C- Dark field photomicrograph of *in situ* hybridization performed on sagittal section of day E14 embryo showing Pitx3 expression in intercostal (icm), neck (nm), axial (am), tongue (t) and limb muscles.

Figure 2.3. Dermomyotome expression of Pitx3 follows Myf5 and is concurrent with MyoD

Dark field photomicrographs of *in situ* hybridizations performed on sections of day E10.5 (frontal A, B) and of day E11.5 (frontal C; sagittal D, E) mouse embryos. Pitx3 mRNA (A, C, D) is detected in dermomyotome derivatives (dm) at day E11.5 (C, D), but not at E10.5 (A). Myf5 is expressed in dermomyotome derivatives (dm) at day E10.5 (B). In contrast, MyoD (E) is present in tongue (t) and dermomyotome derivatives (dm) at E11.5

Figure 2.4. Co-localization of Pitx3 and MyoD in skeletal muscles

A-D (dark fields), **E-F** (bright fields)- *In situ* hybridizations performed on transverse sections of day E15.5 mouse embryos showing co-localization of Pitx3 (A, B) and MyoD (C, D) in hindlimb (hbm) and tail (tln) muscles, axial muscles (am) and the three layers of abdominal wall musculature (bwm). A, C, E are at hindlimb/kidney level whereas B, D, F are at rump level. Weak Pitx3 expression is detected in bladder (bl) (A). Internal structures were lost during slide processing on sections A, C and E.

CHAPITRE 3

ARTICLE

**PITX3 ACTIVATES MOUSE TYROSINE HYDROXYLASE PROMOTER
VIA A HIGH AFFINITY BINDING SITE**

Mélanie Lebel, Yves Gauthier, Alain Moreau, Jacques Drouin*

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

soumis à *Journal of Neurochemistry* le 28 août 2000

RÉSUMÉ

L'apparition successive de Pitx3 et de la tyrosine hydroxylase dans les neurones dopaminergiques de mésencéphale suggère que Pitx3 puisse avoir un rôle dans le contrôle transcriptionnel de la tyrosine hydroxylase. Nous avons de plus identifié plusieurs sites de liaison potentiels pour ce facteur de transcription à homéodomaine dans le promoteur de la tyrosine hydroxylase murin. Nous avons également montré que Pitx3 pouvait activer ce promoteur via sa liaison à un site de haute affinité dans ce promoteur. Nurr1, un récepteur nucléaire orphelin essentiel au développement des neurones dopaminergiques du mésencéphale, n'a pas d'effet sur ce promoteur ni sur l'activation produite par Pitx3. L'activation du promoteur de la tyrosine hydroxylase par Pitx3 semble être spécifique aux cellules P19, ce qui suggère que d'autres mécanismes interviennent dans ce mécanisme. La capacité de Pitx3 à moduler l'activité du promoteur de la tyrosine hydroxylase suggère un rôle pour ce facteur de transcription dans le développement et/ou le maintien des neurones dopaminergiques du mésencéphale.

ABSTRACT

Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme of dopamine and (nor) adrenaline biosynthesis. Regulation of its gene expression is complex and different regulatory mechanisms appear to be operative in various neuronal lineages. Pitx3, a homeodomain-containing transcription factor, has been cloned from neuronal tissues and, in the CNS, mouse Pitx3 is exclusively expressed in midbrain dopaminergic (MesDA) neurons from embryonic day 11 (E11). TH appears in these neurons at E11.5, consistent with a putative role of Pitx3 in TH transcription. We show that Pitx3 activates the TH promoter through direct interaction with a single high affinity binding site within the promoter and that this site is sufficient for Pitx3 responsiveness. In contrast, we did not observe an effect of Nurr1, an orphan nuclear receptor essential for normal development of MesDA neurons, on TH promoter activity. Pitx3 activation of TH promoter activity appears to be cell-dependent suggesting that Pitx3 action may be modulated by other(s) regulatory mechanism(s) and factor(s).

INTRODUCTION

The complexity of the mammalian brain depends, in part at least, on the diversity of differentiation pathways taken by neuronal cells. Several genes are known to define large domains of the central nervous system during early development, acting on mitotic precursors. These genes pattern the neuroepithelium and specify the identity of neuronal precursors along dorso-ventral and antero-posterior axes (Lumsden and Krumlauf 1996; Tanabe and Jessell 1996). Final differentiation occurs once precursors have exited the cell-cycle and is characterized by expression of the enzymes or neurotransmitters required for neural functions. Few genes have been implicated in these late events of differentiation of specific neuronal populations (Edlund and Jessell 1999; Goridis and Brunet 1999).

The midbrain dopaminergic (MesDA) neurons have been actively studied because of their unique character, ease of identification and their involvement in the pathogenesis of Parkinson's disease. As other ventral neurons in the central nervous system, their early development is dependent of Sonic Hedgehog (Shh), which is secreted by notochord and floorplate (Echelard and al. 1993; Roelink and al. 1994; Chiang and al. 1996; Ericson and al. 1997). Their differentiation on the rostral side of the midbrain-hindbrain boundary (MHB) appears to be induced by FGF8, which is produced at the boundary. These two morphogens (Shh and FGF8) were sufficient to induce MesDA neuronal differentiation in explants taken from dorsal midbrain and telencephalon (Ye and al. 1998) and in neuronal stem cells originating from embryonic stem (ES) cells (Lee and al. 2000).

Two genes potentially required for the late differentiation of these neurons have been identified recently. Nurr1, an orphan nuclear receptor expressed widely in the mouse brain is the only member of its family [which includes Nur77 (NGFI-B) and NOR1] to be expressed in MesDA neuron precursors, from embryonic day 10.5 (E10.5) (Zetterstrom and al. 1996). This may explain why inactivation of the Nurr1 gene in mice specifically affected MesDA neurons. Indeed, MesDA neurons degenerate and die by apoptosis around day E18.5 in Nurr1 knock-out mice (Zetterstrom and al. 1997; Wallen and al. 1999). However, Nurr1 is not sufficient by itself to promote dopaminergic differentiation of neuronal stem cells (Wagner and al. 1999).

Pitx3 (Ptx3), an homeodomain-containing transcription factor, is expressed from day E11 in mouse MesDA neuron precursors. This is the only site of Pitx3 expression in the CNS and its expression is maintained throughout adult life in men and mice (Smidt and al. 1997). This expression is unaffected by Nurr1 knock-out, showing the independence of the two pathways (Saucedo-Cardenas and al. 1998). Pitx3 was hypothesized to be a regulator of MesDA tyrosine hydroxylase (TH) expression because of its appearance a half-day before TH during development. The Pitx subfamily of homeoproteins falls within the *paired* class of homeoproteins and together with the Otx genes, these subfamilies constitute a subgroup of mammalian proteins that share similar DNA binding specificity with *Drosophila bicoid* (Wilson and al. 1996). The mechanisms of action of these homeoproteins has been defined for their transcriptional role in expression of downstream target genes in the pituitary gland (Lamonerie and al. 1996; Tremblay and al. 1998; Tremblay and Drouin

1999; Tremblay and al. 1999; Poulin and al. 1997; Poulin and al. 2000; Szeto and al. 1996) reviewed in (Drouin and al. 1998).

TH is the first and rate-limiting enzyme for dopamine biosynthesis and an important marker of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic neurons. The regulation of its expression appears to be complex and implies different mechanisms depending of the site of expression (Kumer and Vrana 1996). Differences have also been observed between species (Gandelman and al. 1990). The precise localization of sequences required for correct expression of TH *in vivo* appears to depend on experimental design and results published so far are often contradictory (Kaneda and al. 1991; Sasaoka and al. 1992; Banerjee and al. 1994; Min and al. 1994; Morgan and al. 1996; Liu and al. 1997; Schimmel and al. 1999). In particular, sequences (and transcription factors) responsible for TH transcription in MesDA neurons are not known.

We show here that the murine TH promoter contains several putative binding sites for Pitx3 and that its activity is stimulated by Pitx3 in transient transfection assays. Further, we show that only one of these sites is a high affinity Pitx3 binding site and that it appears sufficient for Pitx3 activation of transcription. These results demonstrate a direct action of Pitx3 on the mouse TH gene and suggest a role for this homeoprotein during development and/or maintenance of MesDA neurons.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and oligonucleotides

The mouse tyrosine hydroxylase promoter has been kindly provided by Dr Richard Palmiter. Constructs containing sub-fragments of this promoter in front of the luciferase reporter gene were constructed in the pXP1 vector. 4 kb and 1.2 kb TH promoter fragments were sub-cloned with *EcoRV-SalI* and *MscI-SalI*, respectively. The -762 bp construct was obtained by *XhoI* internal deletion of the 4 kb construct. The -452 bp, -305 bp and -157 bp TH promoter fragments were amplified by PCR, cloned as *KpnI-SalI* fragments in pXP1 and sequenced before use. Point mutations were made using pALTER (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The oligonucleotide sequences used to insert mutations in site III, IV and V are, respectively, TGAACCCTTGTGGACTACTGCATGGGCGCT, TATGCCCTGGTATTAGTCGAGAGCTCTA, and TGCAATTAGATCGACTAGTACGGAGGCTCT (bold characters are the mutated nucleotides). Double mutation was performed in a single round of mutagenesis by using two mutant oligonucleotides at the same time. Mutant promoters were sub-cloned in pXP1 and have been fully sequenced prior their use. (POMC Pitx site)₃-Luc construct was previously described (Lamonerie and al. 1996). Pitx, Otx and Nurr1 expression vectors were previously described (Smidt and al. 1997; Drouin and al. 1998; Tremblay and al. 1999; Maira and al. 1999).

Cell culture

Embryonic carcinoma P19S18 cells (Rossant and McBurney 1982) were cultured in α -MEM (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum or in α -MEM supplemented with 2.5% FBS serum and 7.5% DBS serum during retinoic acid (RA) treatment. Neural differentiation of P19 cells (P19RA) was performed by treating P19 monolayers at 70% confluence with 10^{-6} M RA for four days. The sixth day, cells were harvested and replated for use. This step eliminated the few cells that failed to differentiate. CV-1 and PC12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (GibcoBRL) supplemented with 10% fetal bovine serum. All cultured cells were maintained at 37°C in humidified air containing 5% CO₂.

Transient transfections

For luciferase assays, cells were plated at 50,000 cells/well in 12-wells plates and transfected the day after. P19, P19RA and CV-1 cells were transfected with the calcium phosphate co-precipitation method. 1.5 μ g of reporter plasmid was transfected in each well plus the indicated amount of expression vector(s). Empty expression vector and pBluescript were added to obtain the same total amount of expression vector and a total of 2.5 μ g of DNA in each well. 18 hours after transfection, media were changed. Cells were harvested 40 to 44 hours after transfection and luciferase activity measured as previously described (Lamonerie and al. 1996). PC12 cells were transfected with LipofectAMINE (Pharmacia) according to the manufacturer's recommendations using 500 ng of reporter and a

total of 1.5 μg of DNA in each well of 500,000 cells. Transfected cells were harvested 24h later for luciferase activity measurement.

For preparation of nuclear extracts, CV-1 cells were plated in 100-mm culture dishes (500 000 cells each) and transfected using the calcium phosphate co-precipitation method with 20 μg of DNA/dish. Media were changed 18 hours after transfection and nuclear extracts were prepared 40-44 hours post-transfection.

Nuclear extracts

Transfected cells were washed once and harvested in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 6 mM EDTA. Cells were then centrifuged and resuspended in 400 μl of buffer A (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM dithiothreitol [DTT] and 10 μg each of the protease inhibitors leupeptin, aprotinin and pepstatin /ml). Cells were incubated on ice for 15 min before addition of 25 μl of NP-40 followed by vigorous vortexing. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in 50 μl of buffer B (10 mM HEPES [pH 7.9], 0.1 mM EGTA, 0.4 M NaCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT and 10 μg each of protease inhibitors as above/ml) and shaken vigorously at 4°C for 1h. The extracts were centrifuged and the concentration of the supernatant was estimated by the Bradford assay.

Pitx3 antiserum

Sequences encoding amino acids 9 to 45 of rat Pitx3 were sub-cloned in frame with MBP and GST into their respective vectors. The fusion proteins were

purified from *E. coli* BL-21 according to the maltose and sepharose beads manufacturer's recommendations (New England Biolabs and Pharmacia Biotech, respectively). Antibodies were raised by injection of 100 µg of MBP-Pitx3_{9,45} in New Zealand female rabbits; two booster injections were made at 4 and 6 weeks after control injection. After assessment of immunological response by Western blot, the rabbits were sacrificed and serum collected. The anti-serum was purified on a GST-Pitx3_{9,45} column to obtain an affinity-purified antibody preparation.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The following EMSA probes were synthesized:

POMC site: CAGGATGCTAAGCCTCTGTCCA (coding)

TGGACAGAGGCTTAGCAT (reverse),

site I: GGAGATGATAATCAGAGGAATC (coding)

GATTCCTCTGATTATCAT (reverse),

site II: TAGAGGAATAATCTTTCTGAAA (coding)

TTTCAGAAAGATTATTCC (reverse),

site III: CCCTTGGGTAATCCAGCATGGG

(coding) CCCATGCTGGATTACCCA (reverse),

site IV: GAGCTCTCTAATCAAACCAGGG (reverse)

CCCTGGTTTGATTAGAGA (coding),

site V: ATTAGATCTAATGGGACGGAGG (coding)

CCTCCGTCCCATTAGATC (reverse) and

site VI: CTGACGTCAAAGCCCCTCTGGG (coding)

and CCCAGAGGGGCTTTGACG (reverse). Probes were labeled by Klenow fill-in in presence of radioactive (^{32}P) dCTP or dATP. 50,000 CPM of equivalent specific activity probes were used in each reaction with 5 μg of nuclear extracts. In supershift experiments, 5 μg of immunopurified immunoglobulins were used per reaction. Binding reactions were performed in 20 μl of binding buffer (25 mM HEPES [pH 7.9], 84 mM KCl, 10% Glycerol and 5 mM DTT) and incubated on ice for one hour. Binding reaction mixes were separated on non-denaturing 5% polyacrylamide gel in Tris-Glycine buffer (40 mM Tris and 195 mM Glycine) at 200V for 3 hours, at 4°C. Gels were dried and exposed for autoradiography overnight at room temperature.

RESULTS

The mouse TH promoter contains several Pitx3 putative sites

The TH promoter was searched for putative Pitx3 binding sites. As for other homeoproteins with *bicoid* DNA binding properties, Pitx3 binds a consensus site similar to TAA(T/G)C(C/T) (Wilson and al. 1996; Tremblay and al. 1998; Smidt and al. 1997). Some mismatches within this consensus site are compatible with high affinity DNA binding (Tremblay and al. 1998). This analysis revealed four putative sites in the first kb of the mouse TH promoter (Sites I, II, III and IV in Fig. 1A). We also considered another putative site of action (site V) because of previous work showing that this site is a target for another homeoprotein, Arix (Phox2A in mouse) in noradrenergic cells (Zellmer and al. 1995). Two of these sites (I and V) are perfectly conserved between mouse and rat. Two sites (II and III) are perfect consensus in mouse, but the homologous rat sequences lack the A at the third position and the T at the fourth position (site II) or the first T of the site (site III). We finally included in our analysis a VIth site because another group suggested a Pitx3-dependent effect through this site (Cazorla and al. 2000).

Pitx3 activates the TH promoter in P19 cells

In order to determine if Pitx3 activates the TH promoter, we performed transient transfections in P19 cells. These cells were derived from a mouse embryonic carcinoma and they will differentiate into different cell types when treated *in vitro* with different inducers. Upon retinoic acid (RA) treatment, P19 cells

differentiate into neuronal cells. Most of these neuronal cells have a GABA-ergic phenotype and less than 1% are TH-positive (McBurney 1993). P19 cells do not express Pitx3 in their undifferentiated state nor when treated with RA, as determined by RT-PCR (data not shown). Thus, P19 cells are an appropriate model of undifferentiated cells with neuronal potential.

In P19 cells, Pitx3 activated (up to 5-fold activation) transcription from a 4-kb TH promoter placed in front of the luciferase reporter gene and this effect is dose-dependent (Fig 2A). In contrast with results obtained by others working with different cells (Sakurada and al. 1999;Cazorla and al. 2000), we did not observe any significant effect of Nurr1 alone or in combination with Pitx3 in these cells (Fig. 2B). Since others reported cell-specific activities for Pitx3 as well as for Nurr1, we tested a panel of cell lines for responsiveness of the TH promoter to Pitx3 (Fig. 3A). While Pitx3 activated the TH promoter in undifferentiated P19 cells (Fig. 2 and first two lanes of Fig.3A), it had a mild repressive effect in P19 cells treated with RA for neuronal differentiation although Pitx3 can activate a simple Pitx target reporter as well in both cell contexts (Fig. 3B). In addition, Pitx3 had no effect on TH promoter when co-transfected in pheochromocytoma cells (PC12 cells) or fibroblasts (CV-1 cells).

The three members of the Pitx family activated TH promoter similarly (Fig. 4). In contrast, the Otx transcription factors which are related to the Pitx subfamily (Lamonerie and al. 1996) did not significantly activate the TH promoter. These results suggested a unique property of the Pitx transcription factor(s) for TH transcription by contrast to the Otx factors which otherwise share similar DNA

binding specificity (Drouin and al. 1998). This specificity is striking in the view of the likely expression of Otx2 in MesDA neurons (Simeone and al. 1993).

A single target site is responsible for Pitx3 action

In order to determine whether one or more Pitx3 binding site(s) (Fig. 1B) is (are) required for Pitx3 activation of the TH promoter, we generated a series of promoter 5' deletions (Fig. 5A). Deletion of sequences between -4 kb and -762 bp did not affect the response to Pitx3, indicating that the target sequence is within the shorter promoter fragment. Whereas deletion of the upstream sites I and II had no effect, deletion of site III completely abolished the effect of Pitx3, suggesting that sites IV, V and VI are insufficient for Pitx3 responsiveness.

In order to ensure that the loss of Pitx3 responsiveness upon deletion of sequences between -452 and -305 bp resulted from deletion of the putative Pitx3 binding site III but not of other essential regulatory sequences, we introduced point mutations in sites III, V or IV and V (Fig. 5B). In support of the promoter deletion analysis (Fig. 5A), mutagenesis of only site III prevented Pitx3 responsiveness. None of these mutations affected basal promoter activity. Thus, TH site III appears to be entirely sufficient for Pitx3 activation of this promoter.

TH site III is a Pitx3 high-affinity binding site

In order to test the relative affinity of Pitx3 for its putative binding sites in the TH promoter, we performed *in vitro* binding assays with probes derived from the six Pitx3 putative binding site (Fig. 6A). We used nuclear extracts from CV-1 cells

transiently transfected with an expression vector containing Pitx3 coding sequences or with the empty vector. CV-1 cells do not express Pitx3 (RT-PCR, data not shown) and do not have endogenous binding activity for all probes, except site I probe (lanes 4 and 5). As positive control for DNA binding, we used a probe containing the previously characterized (Lamonerie and al. 1996) Pitx binding site of the pro-opiomelanocortin (POMC) promoter (Fig. 6A, lane 3). Of the putative TH sites, only site III bound Pitx3 with similar affinity (lane 9). Sites I, II and VI exhibited faint binding (lanes 5, 7 and 15) and much longer gel exposure was required to detect even fainter binding to sites IV and V (data not shown). We confirmed by supershifting with a Pitx3 antiserum that the band observed with POMC and site III probes did indeed contain Pitx3 (Fig. 6B, lanes 5 and 11). Control IgGs had no effect on Pitx3 complexes (lanes 6 and 12), showing the specificity of the supershift.

In order to definitely support the requirement for Pitx3 binding to the TH promoter, we took advantage of the availability of a single amino acid mutant of the Pitx1 homeodomain which prevents DNA binding (Tremblay and al. 1999). Pitx1 activated the TH promoter as well as Pitx3 (Fig. 4 and Fig. 6C) and the Pitx1 K139A mutant no longer affected TH promoter activity (Fig. 6C), clearly showing the importance of DNA binding by these factors for TH promoter activation.

Taken together, these results show that Pitx3 induces mouse TH promoter activity in P19 cells through direct DNA binding of site III.

DISCUSSION

The present work clearly shows that Pitx3 can contribute to the control of TH promoter activity through direct interaction with the TH promoter. This transcriptional activation depends on the presence (Fig. 5) of a high affinity promoter binding site (Fig. 6A and B) and on Pitx3's ability to bind DNA through its homeodomain (Fig. 6C). However, this ability of Pitx3 to activate TH promoter activity appears to be cell-dependent, suggesting that this function may be subjected to other(s) regulatory mechanism(s). Modulation of Pitx3 activity may play an important role during development, cell differentiation or maintenance of MesDA neurons.

Pitx3 activates TH promoter directly via a specific site

The Pitx3 binding site that we identified within the TH promoter is entirely comparable to other Pitx binding sites in target genes (Tremblay and al. 1998; Amendt and al. 1998; Szeto and al. 1996) and to binding sites for other *paired* proteins of *bicoïd*-related DNA binding specificity (Wilson and al. 1996; Wilson and al. 1993). Indeed, all these high affinity Pitx binding sites contain the consensus sequence TAA(G/T)C(C/T), although some active sites of unknown relative affinity may have a T at the second position (Tremblay and al. 1998). It is noteworthy that all these sites have perfectly conserved residues at 3rd and 5th positions of the consensus. In this context, it is not surprising that site VI of the TH promoter should be of low affinity (Fig. 6A) and that its presence in TH promoter constructs is not

sufficient for Pitx3-dependent activation (Fig. 5A). The implication of this site by Cazorla and al. (Cazorla and al. 2000) in the mechanism of Pitx3 action on the TH promoter is surprising given the present findings. In contrast, the low Pitx3 binding affinity of site II was unexpected since this site has a consensus sequence that appears as good as site III. Differences in the immediate environment of this site in the TH promoter context may explain this fact. Finally, similarly to the site VI, site III of the rat TH promoter has a nucleotide difference with the mouse at the first position of the consensus (Fig. 1B): this difference decreased Pitx3 binding significantly (data not shown) and thus it is likely to render this sequence poorly responsive to Pitx3. Regulatory promoter sequences of the TH promoter appear to differ between species (Gandelman and al. 1990) and thus Pitx3 may still act on the TH promoter of other (than mouse) species through a different binding site. Indeed, such sites have been identified in the rat TH promoter (Schimmel and al. 1999). Further experiments will be needed to confirm the activity of these sites.

Ability to activate TH promoter is restricted to Pitx subfamily

In general, the three members of Pitx sub-family were found to have very similar activities (Tremblay and al. 2000; Smidt and al. 1997; Drouin and al. 1998). Consistent with these observations, the three Pitx factors activate the TH promoter and the closely related Otx homeoproteins do not (Fig. 4). Biologically, only Pitx3 can activate this promoter in MesDA neurons for the trivial reason that Pitx 1 and 2 are not expressed at this site. In the normal developing mouse, MesDA neurons appear to only express Pitx3 (Smidt and al. 1997) since Pitx1 is not expressed at all

in the CNS (Lanctôt and al. 1997) and the brain expression of Pitx2 appeared to exclude the midbrain region. Pitx2 is nonetheless expressed both anteriorly and posteriorly of the MesDA system in the ventral brain (Kitamura and al. 1997). The only related homeoprotein known to be expressed in the midbrain is Otx2 (Simeone and al. 1993) but it did not significantly activate the TH promoter.

Nurr1 has no effect on mouse TH promoter

The presence of a Nurr1 consensus NBRE binding site (Maira and al. 1998) within the TH promoter suggested that this orphan nuclear receptor could influence the activity of this promoter. In addition, physical and transcriptional interactions have been already characterized between Pitx1 and an orphan nuclear receptor, SF-1 (Tremblay and al. 1999; Tremblay and Drouin 1999; Tremblay and al. 1998), suggesting that similar interaction could take place between Pitx3 and Nurr1 in the context of the TH promoter. However, we did not observe any significant effect of Nurr1 on TH promoter activity nor on the activation produced by Pitx3 (Fig. 2B). This is in apparent contradiction with results from other groups who reported activation of TH promoter by Nurr1 (Sakurada and al. 1999; Cazorla and al. 2000). These groups utilized the rat TH promoter in their studies whereas the present work used the mouse promoter. In addition, the action of Nurr1 may depend on cellular context, although we found Nurr1 to potently activate a NurRE-Luc reporter in P19 cells (data not shown).

Pitx3 activates TH promoter specifically in undifferentiated P19 cells

Use of a specific cell line seems to be of particular importance in regard to Pitx3 activation of TH promoter activity. This can reflect the lack for a Pitx3 co-activator in other cell lines and in differentiated P19 cells. Pitx factors are known to interact with several transcription factors from different structural classes (Tremblay and al. 1999; Tremblay and Drouin 1999; Poulin and al. 2000; Szeto and al. 1996) and P19 cells may express a unique factor required for TH promoter activity. It is noteworthy that P19 cells express several genes that are not frequently active in other cell lines, such as Egr1, Gsc, Gbx2 and Wnt1 (Bouillet and al. 1995; Papkoff 1994; Edwards and al. 1991; Sawada and al. 2000). The pluripotent character of P19 cells may be important for Pitx3 activation of TH promoter activity. Similarly, differentiation of MesDA-like neurons *in vitro* was more efficient using ES cells (Lee and al. 2000) than with neuronal stem cells (Wagner and al. 1999), the latter having more restricted differentiation capacities compared to ES cells.

Role of Pitx3 in activation of TH promoter and MesDA neuron development or maintenance

Although the present data suggest that Pitx3 activates TH promoter activity, it is clear that TH can be expressed in the absence of this transcription factor since TH is expressed outside the midbrain where Pitx3 is not present. There are many examples of genes expressed in different tissues under control of different promoter elements and different transcription factors. Therefore, the true role of Pitx3 in MesDA transcription of TH may have to await gene inactivation (complete or

conditional) studies of this gene. In the meanwhile, one mouse model with decreased midbrain Pitx3 expression has been reported. Indeed, *lmx1b*-deficient mice (*lmx1b*^{-/-}) have few remaining Pitx3-positive cells in the midbrain, yet they still exhibit transient TH expression (Smidt and al. 2000). Although these TH-positive cells are not localized where normal MesDA neurons normally are, these results may be taken to suggest that Pitx3 is not essential for MesDA TH expression. Alternatively, the transient TH positive neurons observed in *lmx1b*^{-/-} mice may not truly be MesDA neurons since midbrain development appeared to be severely perturbed in this model. In summary, although different studies have documented the importance of Nurr1 (Zetterstrom and al. 1997; Saucedo-Cardenas and al. 1998), *lmx1b* and probably Pitx3 (Smidt and al. 2000) for MesDA development and/or maintenance, regulation of TH transcription in MesDA neurons (and in particular the precise role of Pitx3) remains difficult to investigate in the absence of an appropriate cellular model system.

Pitx3 could act in the same way as Phox2 in noradrenergic system

Phox2a (Arix in rat) and Phox2b homeoproteins are the only transcription factors identified so far for their implication in transcription of genes for neurotransmitter biosynthesis. Phox2 expression is restricted to the noradrenergic system (Valarche and al. 1993; Pattyn and al. 1997) where Phox2a and Phox2b are essential for proper development (Morin and al. 1997; Pattyn and al. 1999; Pattyn and al. 2000) and where they promote TH and dopamine β-hydroxylase (DBH) expression by direct transcriptional activation through site V in the TH promoter

(Fig. 1B) and a similar site in the DBH promoter (Zellmer and al. 1995;Swanson and al. 2000;Swanson and al. 1997). These homeoproteins act on TH and DBH transcription through cooperation with MASH1, a bHLH factor induced in response to BMP2 signals (Hirsch and al. 1998;Lo and al. 1999;Stanke and al. 1999;Lo and al. 1998). In the MesDA system, Pitx3 could act in a similar way since the Pitx homeodomain was shown to be capable of specific protein:protein interaction with bHLH factors (Poulin and al. 2000).

ACKNOWLEDGMENT

We are very thankful to Dr Richard Palmitter for providing the mouse TH promoter and to Dr Orla Conneely for the Nurr1 cDNA. We also thank Lise Laroche for expert secretarial assistance. This work was funded by the Parkinson Foundation of Canada and by a Glaxo Wellcome/Medical Research Council of Canada /PMAC research chair. M.L. is the recipient of a master's research scholarship from FCAR-FRSQ.

REFERENCES

- Amendt B. A., Sutherland L. B., Semina E. V., and Russo A. F. (1998) The molecular basis of Rieger syndrome. analysis of Pitx2 homeodomain protein activities. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20066-20072.
- Banerjee S. A., Roffler-Tarlov S., Szabo M., and Frohman L. (1994) DNA regulatory sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene direct correct catecholaminergic cell-type specificity of a human growth hormone reporter in the CNS of transgenic mice causing a dwarf phenotype. *Brain Res Mol Brain Res* **24**, 89-106.
- Bouillet P., Chazaud C., Oulad-Abdelghani M., Dolle P., and Chambon P. (1995) Sequence and expression pattern of the Stra7 (Gbx-2) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dynamics* **204**, 372-382.
- Cazorla P., Smidt M. P., O'Malley K. L., and Burbach J. P. (2000) A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* **74**, 1829-1837.
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K. E., Corden J. L., Westphal H., Beachy, and PA. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Drouin J., Lamolet B., Lamonerie T., Lanctôt C., and Tremblay J. J. (1998) The *Ptx* family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 31-36.
- Echelard Y., Epstein D. J., St Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A., and McMahon A. P. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.
- Edlund T. and Jessell T. M. (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-224.
- Edwards S. A., Darland T., Sosnowski R., Samuels M., and Adamson E. D. (1991) The transcription factor, *Egr-1*, is rapidly modulated in response to retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental Biology (Orlando)* **148**, 165-173.
- Ericson J., Briscoe J., Rashbass P., and van Heyningen V. (1997) Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *CSH Symp Quant Biol* **62**, 451-466.
- Gandelman K. Y., Coker G. T., Moffat M., and O'Malley K. L. (1990) Species and regional differences in the expression of cell-type specific elements at the human and rat tyrosine hydroxylase gene loci. *J Neurochem* **55**, 2149-2152.

- Goridis C. and Brunet J. F. (1999) Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Curr Neurobiol* **9**, 47-53.
- Hirsch M. R., Tiveron M. C., Guillemot F., Brunet J. F., Goridis, and C. (1998) Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* **125**, 599-608.
- Kaneda N., Sasaoka T., Kobayashi K., Kiuchi K., Nagatsu I., Kurosawa Y., Fujita K., Yokoyama M., Nomura T., and Katsuki M. (1991) Tissue-specific and high-level expression of the human tyrosine hydroxylase gene in transgenic mice. *Neuron* **6**, 583-594.
- Kitamura K., Miura H., Yanazawa M., Miyashita T., and Kato K. (1997) Expression patterns of */brx1* (Rieg gene), Sonic hedgehog, Nkx2.2, Dlx1 and Arx during zona limitans intrathalamica and embryonic ventral lateral geniculate nuclear formation. *Mech Dev* **67**, 83-96.
- Kumer S. C. and Vrana K. E. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67**, 443-462.
- Lamonerie T., Tremblay J. J., Lanctôt C., Therrien M., Gauthier Y., and Drouin J. (1996) PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* **10**, 1284-1295.
- Lanctôt C., Lamolet B., and Drouin J. (1997) The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817.
- Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., and McKay R. D. (2000) Efficient generation of midbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Neuroscience* **18**, 675-679.
- Liu J., Merlie J. P., Todd R. D., and O'Malley K. L. (1997) Identification of cell type-specific promoter elements associated with the rat tyrosine hydroxylase gene using transgenic founder analysis. *Brain Res Mol Brain Res* **50**, 33-42.
- Lo L., Morin X., Brunet J. F., and Anderson D. J. (1999) Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron* **22**, 693-705.
- Lo L., Tiveron M. C., and Anderson D. J. (1998) MASH1 activates expression of the paired homeodomain transcription factor Phox2a, and couples pan-neuronal and subtype-specific components of autonomic neuronal identity. *Development* **125**, 609-620.
- Lumsden A. and Krumlauf R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-1115.
- Maira M., Martens C., Philips A., and Drouin J. (1999) Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Biol Cell* **19**, 7549-7557.

- McBurney M. W. (1993) P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* **37**, 135-140.
- Min N., Joh T. H., Kim K. S., Peng C., and Son J. H. (1994) 5' upstream DNA sequence of the rat tyrosine hydroxylase gene directs high-level and tissue-specific expression to catecholaminergic neurons in the central nervous system of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 281-289.
- Morgan W. W., Walter C. A., Windle J. J., and Sharp Z. D. (1996) 3.6 kb of the 5' flanking DNA activates the mouse tyrosine hydroxylase gene promoter without catecholaminergic-specific expression. *J Neurochem* **66**, 20-25.
- Morin X., Cremer H., Hirsch M. R., Kapur R. P., Goridis C., and Brunet J. F. (1997) Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. *Neuron* **18**, 411-423.
- Papkoff J. (1994) Identification and biochemical characterization of secreted Wnt-1 protein from P19 embryonal carcinoma cells induced to differentiate along the neuroectodermal lineage. *Oncogene* **9**, 313-317.
- Pattyn A., Hirsch M., Goridis C., and Brunet J. F. (2000) Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene Phox2b. *Development* **127**, 1349-1358.
- Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., and Brunet J. F. (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis. *Development* **124**, 4065-4075.
- Pattyn A., Morin X., Cremer H., Goridis C., and Brunet J. F. (1999) The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* **399**, 366-370.
- Poulin G., Lebel M., Chamberland M., Paradis F. W., and Drouin J. (2000) Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* **20**, 4826-4837.
- Poulin G., Turgeon B., and Drouin J. (1997) NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* **17**, 6673-6682.
- Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V., Norlin S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe Y., Placzek M., Edlund T., and Jessell T. M. (1994) Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**, 761-775.
- Rossant J. and McBurney M. W. (1982) The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J Embryol Exp Morphol* **70**, 99-112.
- Sakurada K., Ohshima-Sakurada M., Palmer T. D., and Gage F. H. (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* **126**, 4017-4026.

- Sasaoka T., Kobayashi K., Nagatsu I., Takahashi R., Kimura M., Yokoyama M., Nomura T., Katsuki M., and Nagatsu T. (1992) Analysis of the human tyrosine hydroxylase promoter-chloramphenicol acetyltransferase chimeric gene expression in transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* **16**, 274-286.
- Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J. D., Le W. D., Smidt M. P., Cox J. J., DeMayo F., Burbach J. P. H., and Conneely O. M. (1998) *Nurr1* is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4013-4018.
- Sawada, K., Konishi, Y., Tominaga, M., Watanabe, Y., Hirano, J., Inoue, S., Kageyama, R., Blum, M., and Tominaga, A. (2000) Goosecoid suppresses cell growth and enhances neuronal differentiation of PC12 cells. *J Cell Sci* **113**, 2705-2713.
- Schimmel J. J., Crews L., Roffler-Tarlov S., and Chikaraishi D. M. (1999) 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors. *Brain Res Mol Brain Res* **74**, 1-14.
- Simeone A., Acampora D., Mallamaci A., Stornaiuolo A., D'Apice M. R., Nigro V., and Boncinelli E. (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* **12**, 2735-2747.
- Smidt M., van Schaick H. S. A., Lanctôt C., Tremblay J. J., Cox J. J., van der Kleij A. A. M., Wolterink G., Drouin J., and Burbach P. H. (1997) A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13305-13310.
- Smidt M. P., Asbreuk C. H., Cox J. J., Chen H., and Johnson R. L. (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nature Neuroscience* **3**, 337-341.
- Stanke M., Junghans D., Geissen M., Goridis C., Ernsberger U., and Rohrer H. (1999) The *Phox2* homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons. *Development* **126**, 4087-4094.
- Swanson D. J., Adachi M., and Lewis E. J. (2000) The homeodomain protein *Arix* promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine beta-hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2911-2923.
- Swanson D. J., Zellmer E., and Lewis E. J. (1997) The homeodomain protein *Arix* interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Biol Chem* **272**, 27382-27392.

- Szeto D. P., Ryan A. K., O'Connell S. M., and Rosenfeld M. G. (1996) P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7706-7710.
- Tanabe Y. and Jessell T. M. (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord [published erratum appears in *Science* 1997 Apr 4;276(5309):21]. *Science* **274**, 1115-1123.
- Tremblay J. J. and Drouin J. (1999) Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone β gene transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 2567-2576.
- Tremblay J. J., Goodyer C. G., and Drouin J. (2000) Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol* **71**, 277-286.
- Tremblay J. J., Lanctôt C., and Drouin J. (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* **12**, 428-441.
- Tremblay J. J., Marzil A., Gauthier Y., and Drouin J. (1999) Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* **18**, 3431-3441.
- Valarche I., Tissier-Seta J. P., Hirsch M. R., Martinez S., Goridis C., and Brunet J. F. (1993) The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* **119**, 881-896.
- Wagner J., Akerud P., Castro D. S., Holm P. C., Canals J. M., Snyder E. Y., Perlmann T., and Arenas E. (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotechnology* **17**, 653-659.
- Wallen a., Zetterstrom R. H., Solomin L., Arvidsson M., Olson L., and Perlmann T. (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* **253**, 737-746.
- Wilson D., Sheng G., Lecuit T., Dostatni N., and Desplan C. (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* **7**, 2120-2134.
- Wilson D. S., Sheng G., Jun S., and Desplan C. (1996) Conservation and diversification in homeodomain-dna interactions: a comparative genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6886-6891.
- Ye W., Shimamura K., Rubenstein J. L., Hynes M. A., and Rosenthal A. (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* **93**, 755-766.

Zellmer E., Zhang Z., Greco D., Rhodes J., Cassel S., and Lewis E. J. (1995) A homeodomain protein selectively expressed in noradrenergic tissue regulates transcription of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Neurosci* **15**, 8109-8120.

Zetterstrom R. H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B. J., Olson L., and Perlmann T. (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250.

Zetterstrom R. H., Williams R., Perlmann T., and Olson L. (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* **41**, 111-120.

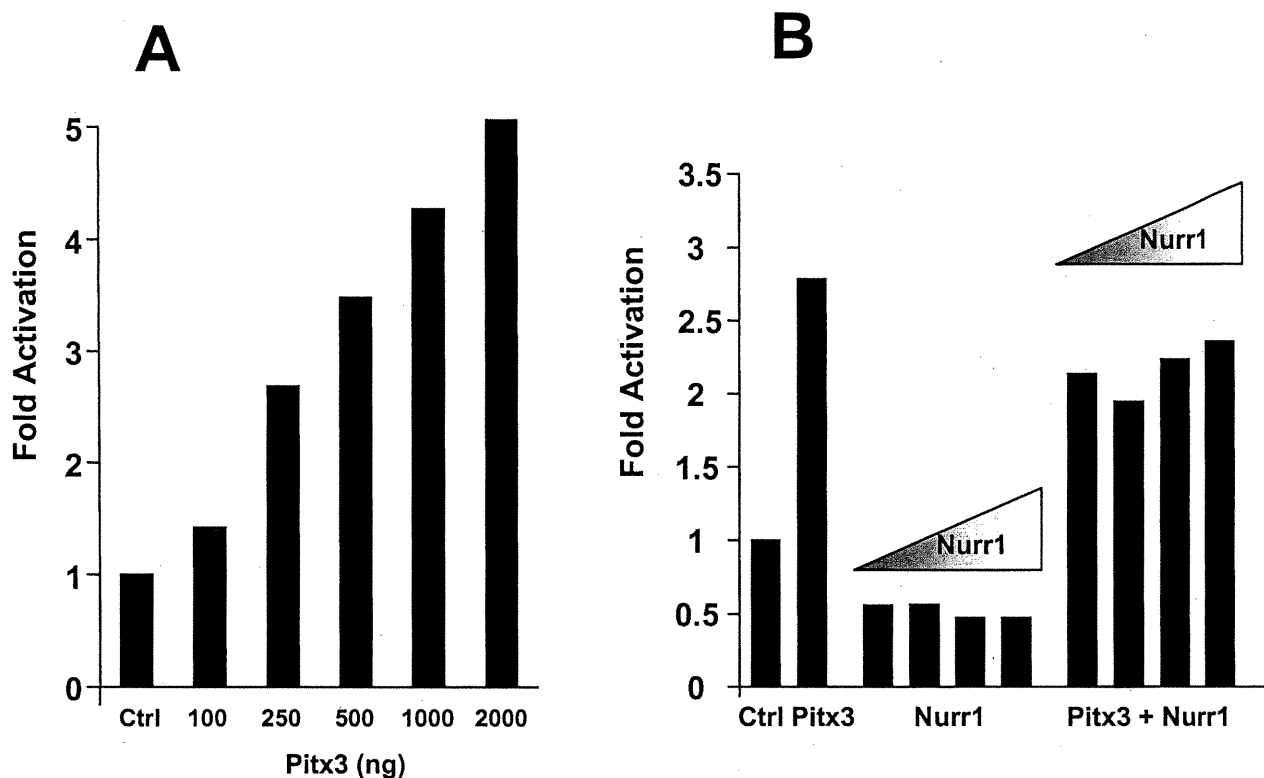


Figure 3.2. Pitx3 activates the mouse TH promoter in P19 cells. A) Pitx3 produces a dose-dependent activation of TH promoter activity in P19 cells. Cells were co-transfected with a luciferase reporter gene containing a 4 kb fragment of the mouse TH promoter and with increasing amounts of Pitx3 expression vector or empty vector (ctrl). B) Nurr1 has no effect on TH promoter nor on the activation produced by Pitx3. Nurr1 expression vector was co-transfected with or without Pitx3 expression vector. A representative experiment of at least three independent transfections performed in duplicata is shown.

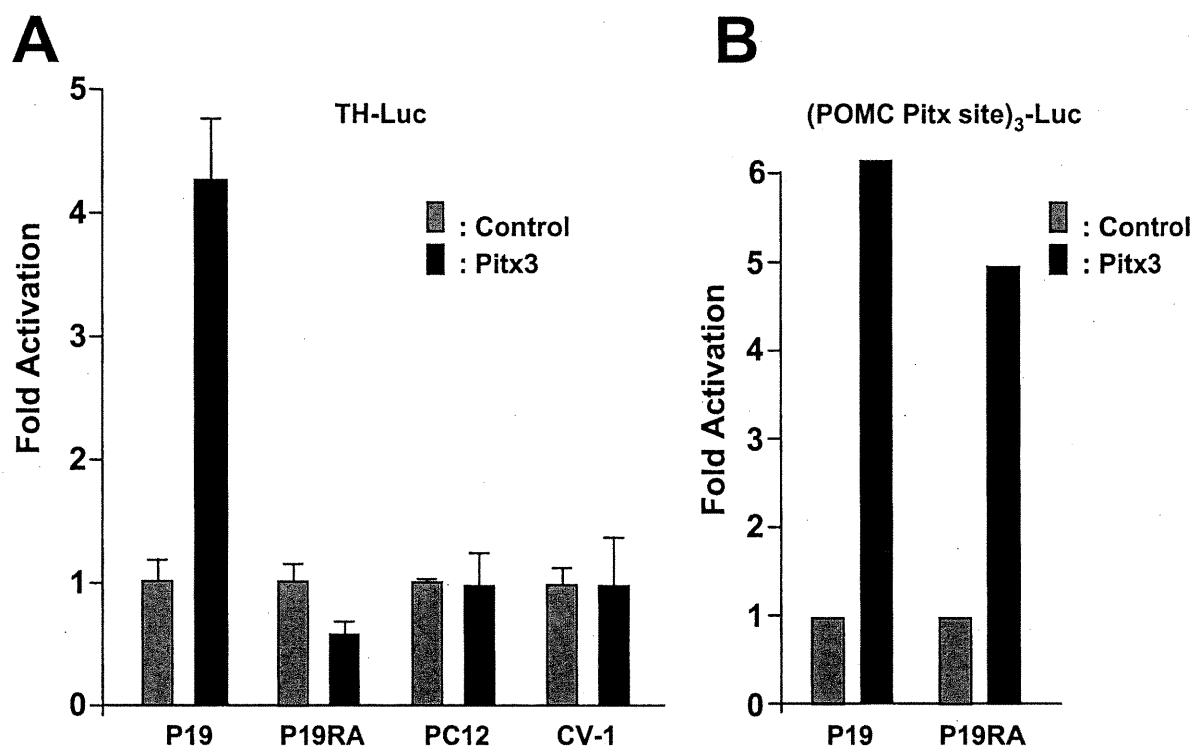


Figure 3.3. Pitx3 effect on TH promoter in different cell lines. **A)** Pitx3 activation of 4 kb TH promoter is observed in undifferentiated P19 cells but not in P19 cells differentiated in neuronal cells (P19RA), pheochromacytoma cells (PC-12) and fibroblasts (CV-1). Co-transfections were performed with Pitx3 or empty expression vector. Means \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicata are shown. **B)** Pitx3 is active in both undifferentiated and differentiated P19 cells. A reporter containing 3 copies of the Pitx binding site from the POMC promoter was used to assess Pitx3 activity (Lamonerie et al. 1996). A representative experiment of three independent transfections performed in duplicata is shown.

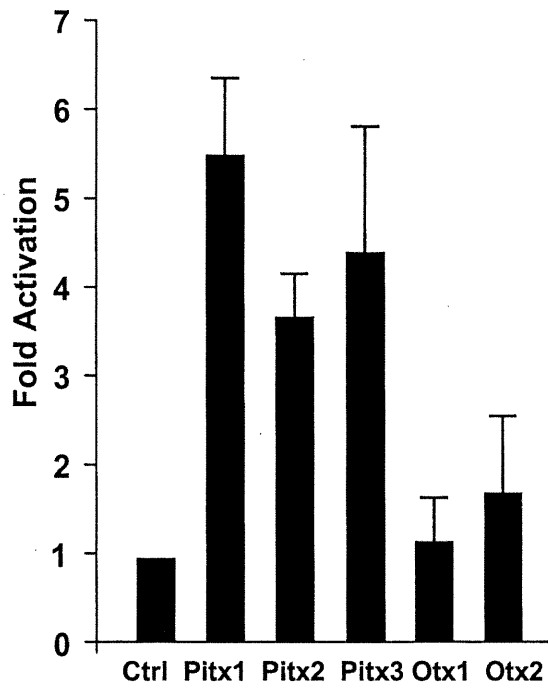


Figure 3.4. Activity of different members of Pitx and Otx subfamilies on 4 kb TH promoter. These experiments were performed in undifferentiated P19 cells as described in the legend to Figure 3.

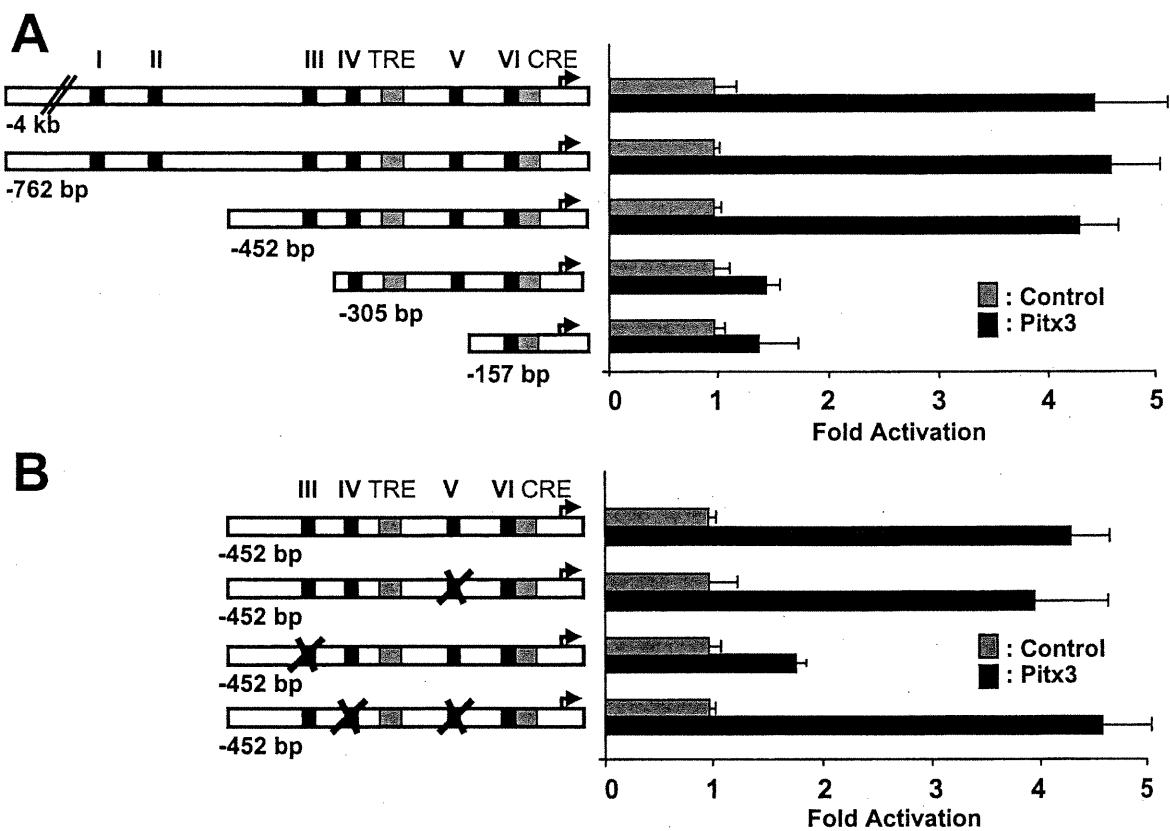
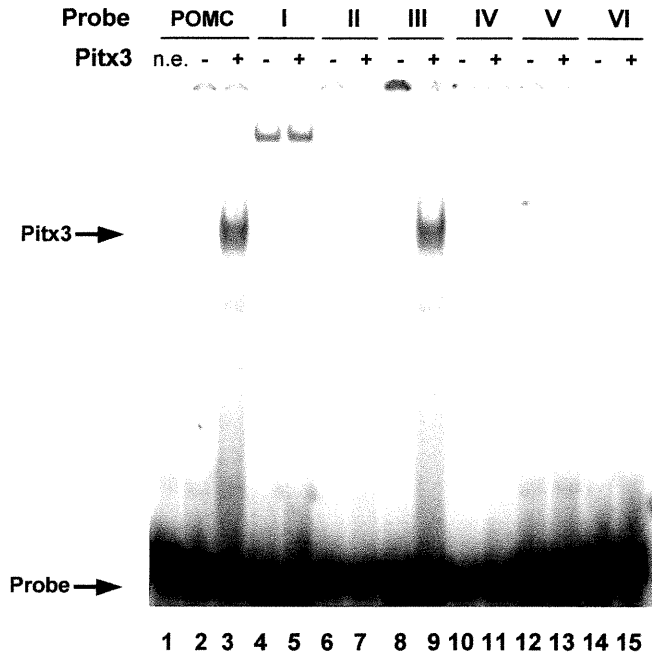
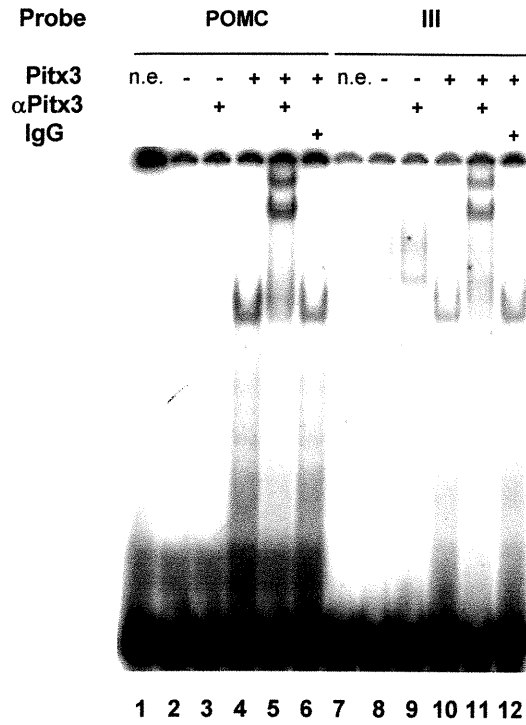


Figure 3.5. Site III is responsible for Pitx3 activation of TH promoter. Transient co-transfections were performed as in Fig. 3 using different 5' deletions (A) and point mutations (B) of the TH promoter in P19 cells.

A



B



C

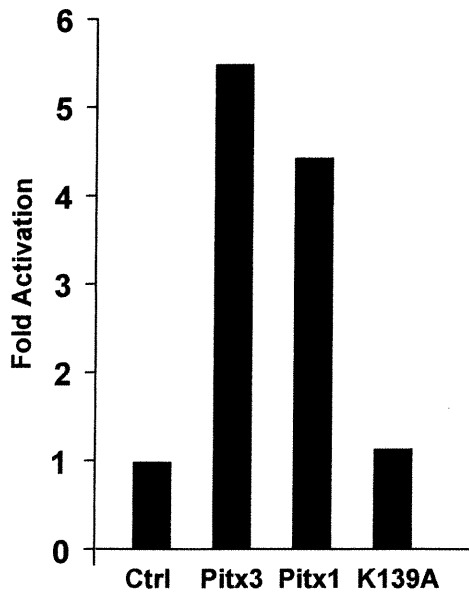


Figure 3.6. Pitx3 binds site III with high affinity *in vitro*. **A)** *In vitro* binding assays performed with CV-1 nuclear extracts transiently transfected with expression vectors containing (+) or not (-) Pitx3 coding sequences. Probes of same length and specific activity were produced for each mouse TH promoter and rat POMC promoter putative Pitx3 binding site (Fig. 1B). n.e. : no extract. **B)** Supershift experiment showing that complexes observed with POMC and site III probes contained Pitx3. Immunopurified rabbit anti-Pitx3 (α Pitx3) or control rabbit IgGs were used as indicated. **C)** DNA binding activity of homeodomain is required for TH promoter activation. The K139A mutant of Pitx1 (Tremblay et al. 1999) is a single residue mutant in which lysine 50 of the homeodomain was changed to an alanine, resulting in a loss of DNA binding capacity. Pitx3, Pitx1 or K139A expression vectors were co-transfected in P19 cells with the 1.2 kb TH reporter. A representative experiment is shown.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Similarités dans les processus développementaux des structures exprimant Pitx3

L'étude de l'expression de Pitx3 chez l'embryon de souris a permis de clarifier son patron d'expression, particulièrement en ce qui concerne le tronc et les membres. Les seules données publiées à ce jour étaient incomplètes et comportaient certaines erreurs. Par exemple, on a identifié les tissus exprimant Pitx3 dans les membres inférieurs comme étant le mésenchymes en condensation autour du fémur. Les muscles intercostaux avaient également été identifiés de façon similaire (Semina 1998). Les études effectuées dans le cadre de ce mémoire montrent que Pitx3 est exprimé dans le muscle squelettique et que cette expression co-localise avec celle de MyoD. Ainsi, les sites d'expression de Pitx3 dans l'embryon en développement peuvent être regroupés en trois catégories bien distinctes: neurones dopaminergiques du mésencéphale, muscles squelettiques, certains dérivés des crêtes neurales mésencéphaliques.

Il est intéressant de constater que malgré d'importantes divergences dans l'origine de ces structures, il existe des similitudes frappantes au niveau des signaux connus comme étant responsables de leur induction. En effet, le dermomyotome, duquel dérivent les muscles squelettiques, est influencé par Shh, Wnt (1, 3 ou 4) ainsi que BMP4. Les signaux Shh et Wnt ont un effet inducteur sur les précurseurs musculaires alors que BMP4 a un effet répresseur. Cet effet répresseur semble d'ailleurs important afin d'empêcher une différenciation trop rapide des cellules musculaires (Currie et Ingham 1998). Bien que le rôle de BMP4 au sein du tube neural dorsal soit différente (Lee et Jessell 1999), il n'en reste pas moins qu'il a un effet répresseur sur l'induction des neurones ventraux, dont font partie les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ces neurones sont ainsi également influencés

par Shh, provenant du plancher du tube neural (Hynes et al. 1995b). Il a aussi été montré que bien que cet inducteur ne soit pas essentiel au développement du dermomyotome et de ses dérivés, il pouvait tout-de-même induire Myf5, un bHLH myogénique important pour le développement des muscles épaxiaux, et ainsi promouvoir le développement musculaire (Cossu et al. 1996a; Borycki et al. 1999). Les signaux Wnt1 provenant du tube neural dorsal semblent quant à eux essentiels au bon développement du dermomyotome. On ne sait pas trop si ce mécanisme pourrait s'appliquer plus particulièrement dans le cas des neurones dopaminergiques du mésencéphale puisque le mésencéphale ne se développe pas du tout en l'absence de Wnt1 (Ikeya et al. 1997). Cependant, on sait que les deux inducteurs des neurones dopaminergiques du mésencéphale sont Shh et FGF8 (Ye et al. 1998). Or, il a récemment été montré que FGF8 induisait l'expression de Wnt1 via *lmx1B* dans la barrière mésencéphale-métencéphale (MHB) (Adams et al. 2000). De plus, l'expression de *Pitx3* chez les souris dont le gène *lmx1b* a été inactivé est grandement diminuée (Smidt et al. 2000b). Il ne serait donc pas surprenant que Wnt1 contribue au moins en partie au développement de ces neurones. Il est peu aisé de discuter des signaux impliqués dans le développement des dérivés des crêtes neurales puisque peu de choses sont connues à ce sujet. On sait tout-de-même que Wnt1 est essentiel à l'expansion de ces cellules. Cet effet est remarquable spécialement chez les souris dont le gène Wnt1 a été inactivé (Ikeya et al. 1997). Le cartilage nasal et l'oeil sont deux structures dérivées des cellules des crêtes neurales dans lesquelles *Pitx3* est exprimé. Dans les deux cas, ces cellules dérivent plus précisément toutes des crêtes neurales du mésencéphale (Le Douarin 1982). Certaines évidences expérimentales (essentiellement des expériences de greffe) font croire que ces cellules sont grandement influencées par les signaux reçus de leur environnement, ce qui se reflète d'ailleurs par leur grande plasticité développementale. L'expression normale de Wnt1 dans le tube neural se limite au

plafond du tube neural et ce, sur pratiquement toute la longueur du système nerveux. L'exception à cette règle est le MHB où Wnt1 est exprimé de façon beaucoup plus étendue. Il est tout-de-même intéressant de faire la corrélation entre cette expression plus importante de Wnt1 justement dans la région d'où proviennent les cellules des crêtes neurales qui exprimeront subséquentement Pitx3. On ne peut pas pousser cette corrélation plus loin par manque de connaissance sur le rôle que pourrait avoir Wnt1 durant le développement de ces structures, mais il s'agit tout-de-même d'une coïncidence qu'il serait intéressant d'étudier plus à fond dans le futur.

Ainsi, trois types de signaux différents influencent de manière potentiellement similaire les précurseurs des neurones dopaminergiques du mésencéphale et les précurseurs musculaires somitiques. Ces similitudes pourraient également s'étendre au développement des dérivés des crêtes neurales mésencéphaliques. Il se pourrait que ces inducteurs contribuent à l'expression normale de Pitx3 dans l'embryon en développement. Souvent, les gènes exprimés dans des structures différentes d'un organisme le sont grâce à des mécanismes de contrôle distincts pour chaque structure. On retrouve couramment dans le promoteur de tels gènes des éléments spécifiques à chacune de leur région d'expression. Il en est probablement de même pour Pitx3. Cependant, le fait que les mêmes voies de signalisation soient impliquées dans la différenciation des structures exprimant Pitx3 laisse croire que certains mécanismes de contrôle spécifique de son expression pourraient être communs aux différents sites d'expression de Pitx3. Des études visant à étudier la régulation du promoteur de Pitx3 sont présentement en cours au laboratoire, ce qui contribuera à vérifier cette hypothèse. Récemment, une diminution importante de l'expression générale de Pitx3 a été observée chez les souris Aphakia à cause d'une délétion de 652 pb dans ce promoteur. Il sera d'autant plus intéressant d'étudier les éléments de régulation transcriptionnelle s'y trouvant en temps normal (Semina et al. 2000).

4.2 Cibles transcriptionnelles de Pitx3

Les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire ont également permis d'identifier la tyrosine hydroxylase en tant que cible transcriptionnelle directe de Pitx3 dans le contexte des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Puisque l'on suppose que les facteurs de transcription à homéodomaine possèdent de nombreuses cibles, Pitx3 influence certainement l'expression d'autres gènes que celui de la tyrosine hydroxylase dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale. Cependant, de tels gènes demeurent toujours à identifier.

L'expression de Pitx3 dans le muscle squelettique suppose qu'il possède également des cibles transcriptionnelles dans le système musculaire. Puisque Pitx1 est aussi exprimé dans certains muscles squelettiques (mais plus tardivement que ne l'est Pitx3) (Lanctôt et al. 1997), des membres de notre laboratoire se sont interrogés quant à la capacité de Pitx1 d'interagir avec MyoD pour activer des gènes-cibles dans le système musculaire. Ils ont ainsi montré que MyoD et Pitx1 activaient de façon synergique le promoteur de l'actine squelettique (Poulin, en préparation). Le mécanisme menant à un tel effet semble complexe et impliquerait la liaison à l'ADN de Pitx1 sous forme de dimère. Bien que non favorisée, la dimérisation des homéodomains de type *paired* possédant une lysine en position 50 de leur homéodomaine n'est pas impossible non plus (Wilson et al. 1993). La synergie entre MyoD et les membres de la sous-famille Pitx s'applique aussi bien avec Pitx3 qu'avec Pitx1, mais n'est pas observée avec Pitx2. Bien que ce mécanisme ait été caractérisé en premier lieu avec Pitx1, il semble qu'il puisse également s'appliquer à Pitx3. Ceci est d'autant plus plausible que Pitx3 est exprimé dans tous les muscles squelettiques alors que Pitx1 est restreint aux membres inférieurs. L'actine squelettique est donc une cible potentielle de choix pour Pitx3 dans le système musculaire en développement. Jusqu'ici aucune autre cible potentielle n'a été identifié pour Pitx3.

4.3 Considérations évolutives

Comme beaucoup d'autres gènes impliqués au cours du développement, la sous-famille Pitx est présente dans le règne animal depuis assez tôt dans l'évolution, ce qui suggère que les trois membres qui la composent originent de duplications entraînant l'acquisition de nouvelles fonctions.

4.3.1 Évolution des structures

Les patrons d'expression de Pitx1, 2 et 3 au cours du développement de la souris sont assez complexes et incluent souvent des structures discrètes pas toujours facilement identifiables. Afin de faciliter l'analyse, seront considérées ici seulement les structures majeures dans lesquelles ces facteurs sont exprimés.

4.3.1.1 Pitx3

Le système dopaminergique du mésencéphale tel qu'on le connaît (comportant notamment une substance noire) est apparu chez les amniotes (Les amniotes sont les animaux dont les embryons sont protégés par un oeuf à coquille rigide. On considère généralement que les premiers amniotes ont été les reptiles, à l'exception de la tortue qui est anamniote) (Bonn 1987;Hornby et al. 1987;Meek et al. 1989;Roberts et al. 1989;Wicht et Himstedt 1988;Yoshida et al. 1983). Les vertébrés anamniotes possèdent bien quelques neurones dopaminergiques, mais pas de système comparable à celui des amniotes (Gonzalez et Smeets 1991). La distinction entre amniotes et anamniotes correspond aussi à l'apparition de la structure des somites. Le somite amniote produit en effet deux lignées musculaires: muscles épaxiaux et muscles hypaxiaux. Une telle division est absente chez les anamniotes (Currie et Ingham 1998). Il est finalement assez difficile de juger du moment de l'apparition de l'oeil chez les vertébrés. Les cellules des crêtes neurales sont des structures qui leur sont uniques (Le Douarin 1982), mais les structures qui en dérivent ont quelque peu évoluées depuis les premiers vertébrés. En effet, l'oeil

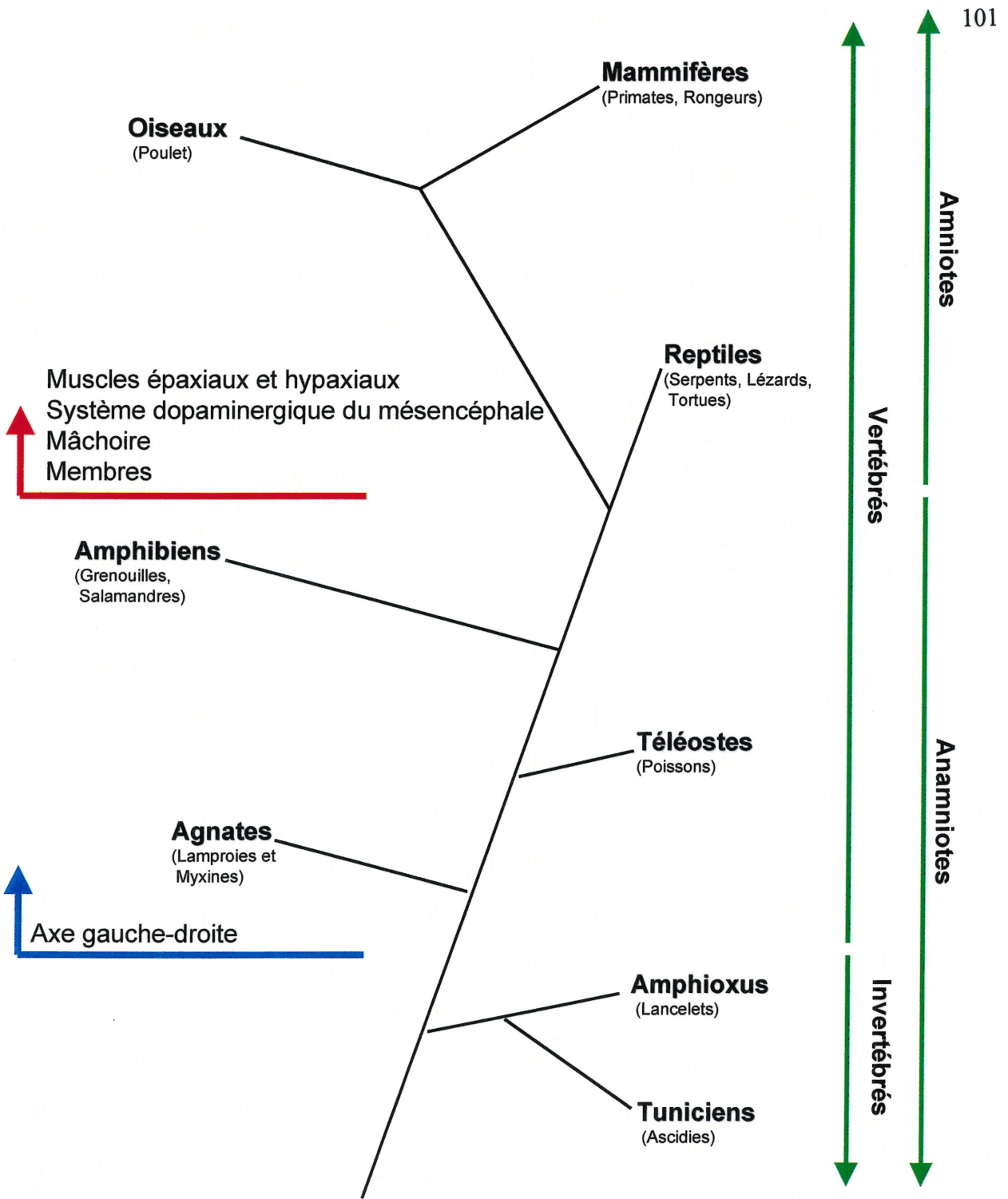


Figure 4.1 Arbre phylétique simplifié des Chordés

des agnathes (vertébrés inférieurs) comporte bel et bien une lentille qui origine des crêtes neurales, mais les autres structures de cette origine, y compris les muscles oculaires, ne sont pas présents. Bien que les amphibiens aient des yeux comportant plus de structures de cette origine, les reptiles peuvent être considérés comme étant les premiers animaux dont les yeux ont une structure semblable à celle des vertébrés supérieurs (Fritzscht 1998).

4.3.1.2 Pitx1

Deux structures caractérisent principalement le patron d'expression de Pitx1: les membres inférieurs et la mandibule.

Ironiquement, les membres les plus primitifs chez les vertébrés se retrouvent chez les serpents. Bien que cela ne soit pas toujours évident à première vue, certains serpents actuels tel que le python possèdent des membres vestigiaux qui ressemblent à ceux des grands serpents primitifs éteints (Caldwell et Lee 1997;Coates 1994;Lee 1997). Ces membres sont même colonisés par des précurseurs musculaires en provenance du dermomyotome latéral (Raynaud et Adrian 1975). Ce sont également les reptiles qui les premiers dans l'évolution possèdent une mâchoire attachée à la boîte crânienne et formée d'une mandibule et d'une maxillaire bien distinctes.

4.3.1.3 Pitx2

Mis à part le muscle, l'expression de Pitx2 joue un rôle majeur dans l'établissement de l'axe gauche-droite des organes internes. L'assymétrie gauche-droite semblent être une caractéristique propre à tous les vertébrés (Harvey 1998).

Contrairement à Pitx1 et 3, qui sont exprimés principalement dans des structures spécifiques aux amniotes, Pitx2 participe quant à lui à un mécanisme qui semble un peu plus ancien, présent même chez les vertébrés les plus primitifs. Cette

observation concorde bien avec l'homologie relative de ces protéines entre elles. En effet, Pitx1 et 3 sont très semblables, alors que Pitx2 est légèrement plus divergent. Évolutivement, cela signifierait que la duplication du premier gène Pitx a donné lieu à Pitx2 et Pitx1/3 et qu'une seconde duplication s'est produite plus tard, ce qui a produit Pitx1 et 3 à partir de Pitx 1/3. Évidemment, cela n'a de sens que si le taux de mutation dans chacun de ces gènes est le même, ce dont on ne peut malheureusement pas être absolument certains.

Les capacités transcriptionnelles des facteurs Pitx vont également dans ce sens. En effet, ces trois facteurs de transcription ont généralement les mêmes propriétés lorsque testés en culture cellulaire. Ils peuvent par exemple tous activer le promoteur de la tyrosine hydroxylase lorsque surexprimés dans des cellules P19. Par contre, la synergie observée entre Pitx 1 ou 3 et MyoD lors de l'activation du promoteur de l'actine squelettique n'est pas reproduite par Pitx2. Il s'agit cependant du seul exemple de la sorte répertorié jusqu'ici. Au contraire, les facteurs de transcription de la sous-famille Otx, qui sont les plus apparentés aux Pitx, partagent moins caractéristiques avec ceux-ci. On sait qu'ils lient aussi efficacement les mêmes cibles que les Pitx, mais ils n'activent pas la transcription des mêmes gènes-cibles. Par exemple, Otx1 et 2 n'activent pas significativement le promoteur de la tyrosine hydroxylase, au contraire des Pitx.

4.3.2 Duplication des gènes, acquisition de nouvelles fonctions et évolution

Les gènes Pitx semblent tous provenir d'un seul Pitx qui s'est dupliqué au cours de l'évolution. Ceci concorde bien avec l'identification d'un seul homologue de Pitx chez la Drosophile, D-Pitx. Par contre, celui-ci ne semble pas avoir de fonction précise chez la Drosophile. Son inactivation ainsi que les différentes expériences de

surexpression effectuées avec ce gène n'ont pas produit de résultats informatifs quant à sa fonction (Vorbruggen et al. 1997). Cela est d'autant plus surprenant sachant que les inactivations respectives des gènes *Pitx1* et *Pitx2* chez la souris ont produit des phénotypes très marqués (Lanctôt et al. 1999b; Szeto et al. 1999; Gage et al. 1999b). En général, c'est plutôt le phénomène inverse qui est observé: le phénotype d'une inactivation est souvent très marqué chez la *Drosophile* alors qu'il est plus discret chez la souris. Par exemple, la mutation *engrailed* chez la *Drosophile* produit un phénotype drastique auquel on pouvait s'attendre connaissant le patron d'expression de ce facteur de transcription (Kornberg 1981; Weir et Kornberg 1985). Par contre, l'inactivation de *En1* ou de *En2* chez la souris ne produit que des phénotypes partiels à cause de l'existence d'une certaine redondance entre ces deux facteurs de transcription dans certaines structures, (Loomis et al. 1996; Wurst et al. 1994; Millen et al. 1994). Une double inactivation est dans ce cas nécessaire pour obtenir un phénotype reflétant bien le rôle de ces deux gènes (Joyner 1996). De façon générale, ces effets de redondance plus ou moins marqués seraient produits par des gènes très semblables qui sont apparus au cours de l'évolution suite à des duplication de gènes (Cooke et al. 1997).

La duplication de gène serait un mécanisme évolutif par lequel seraient créés de nouveaux gènes à partir des anciens. Une copie d'un gène est effectuée et cette copie peut accumuler bon nombre de mutations, en autant que cela ne nuise pas à la fonction du gène de départ. En mutant ainsi et en voyant son patron d'expression se modifier, la copie de gène acquiert de nouvelles fonctions distinctes des fonctions du gène de départ (Cooke et al. 1997). D'un point de vue strictement évolutif, les effets

de redondance fonctionnelle observés dans certaines expériences d'inactivation de gènes ne proviendraient pas tous du fait de l'existence de "mécanismes de secours" ou de "bouées de sauvetage". Certains cas pourraient également être expliqués par le fait qu'un gène et sa "copie récente" ont encore des fonctions très semblables. La copie, dans ce cas-ci, n'aurait tout simplement pas eu le temps nécessaire à l'acquisition de nouvelles fonctions distinctes depuis sa création. Mais dans ce cas, ce ne serait qu'une question de temps (Cooke et al. 1997).

Dans ce contexte, l'absence de phénotype dans les expériences d'inactivation de l'homologue de Pitx1 chez la Drosophile porte à réfléchir. Ce gène a-t-il réellement une fonction chez la Drosophile? Les structures dans lesquelles sont exprimés les différents membres de la sous-famille Pitx sont récentes du point de vue évolutif, ce qui pourrait laisser croire que ces gènes ont acquis leur fonction tout récemment. Pitx2 pourrait avoir acquis son rôle chez les vertébrés primitifs. Pitx1 et 3, potentiellement dupliqués de façon plus récente, pourraient voir leurs véritables fonctions entrer en jeu seulement chez les amniotes. Il serait tout-de-même très surprenant que Pitx1 n'ait réellement aucune fonction chez la Drosophile. Comme les auteurs le soulignent, il est probable que Pitx1 ait une fonction au niveau cellulaire plutôt qu'au niveau du "patterning" général de l'embryon (Vorbruggen et al. 1997). Le rôle de Pitx1 dans les cellules de Drosophile manque peut-être tout simplement de sens dans un tel contexte. Par exemple, des membres de notre laboratoire caractérisent présentement un rôle de Pitx1 dans la prolifération des chondroprogéniteurs. Cette fonction pourrait expliquer la phénotype squelettique

observé chez les souris dont le gène Pitx1 a été inactivé. Un rôle plus cellulaire et non pas de “patterning” est donc tout-à-fait plausible pour Pitx1, mais une fonction équivalente chez la Drosophile risque de ne pas être très utile.

Il est fort probable que les gènes Pitx proviennent de duplication d'un ancêtre commun. De plus, leur patron d'expression respectif ainsi que la difficulté à identifier une fonction pour D-Pitx chez la Drosophile laissent croire que ces gènes ont acquis leurs fonctions relativement récemment au cours de l'évolution.

Les travaux présentés dans le cadre de ce mémoire ont permis de préciser de façon importante le patron d'expression de Pitx3 au cours du développement embryonnaire de la souris. De plus, une cible transcriptionnelle a été identifiée pour Pitx3. Ce facteur de transcription active directement le promoteur murin de la tyrosine hydroxylase via un site de liaison de haute affinité. Ces résultats laissent envisager un rôle pour Pitx3 dans le développement des neurones dopaminergiques, mais aussi dans celui des muscles squelettiques et des yeux. Néanmoins, le rôle biologique réel de Pitx3 demeure à être déterminé. L'étude du rôle de ce gène dans des souris modifiées génétiquement pour exprimer ectopiquement ce gène ou pour l'inactiver aideront à mieux comprendre la fonction réelle de Pitx3 au cours de l'embryogenèse chez la souris.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams K. A., Maida J. M., Golden J. A., et Riddle R. D. (2000) The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmus organizer. *Development* **127**, 1857-1867.
- Anderson D. J. (1997) Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. *Trends Genet* **13**, 276-280.
- Arber S., Han B., Mendelsohn M., Smith M., Jessell T. M., et Sockanathan S. (1999) Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* **23**, 659-674.
- Banerjee S. A., Roffler-Tarlov S., Szabo M., et Frohman L. (1994) DNA regulatory sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene direct correct catecholaminergic cell-type specificity of a human growth hormone reporter in the CNS of transgenic mice causing a dwarf phenotype. *Brain Res Mol Brain Res* **24**, 89-106.
- Bonn U. (1987) Distribution of monoamine-containing neurons in the brain of a teleost, *Carassius auratus* (Cyprinidae). *Journal fur Hirnforschung* **28**, 529-544.
- Borycki A. G., Brunk B., Tajbakhsh S., Buckingham M., Chiang C., et Emerson C. P., Jr. (1999) Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* **126**, 4053-4063.
- Briscoe J., Pierani A., Jessell T. M., et Ericson J. (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-445.
- Briscoe J., Sussel L., Serup P., Hartigan-O'Connor D., Jessell T. M., Rubenstein J. L., et Ericson J. (1999) Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* **398**, 622-627.
- Broccoli V., Boncinelli E., et Wurst W. (1999) The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature* **401**, 164-168.
- Burglin T. R. (1997) Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucl Acids Res* **25**, 4173-4180.
- Caldwell M. W. et Lee M. S. Y. (1997) A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. *Nature* **386**, 705-709.
- Castillo S. O., Baffi J. S., Palkovits M., Goldstein D. S., Kopin I. J., Witta J., Magnuson M. A., et Nikodem V. M. (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene. *Mol Cell Neurosci* **11**, 36-46.

- Cazorla P., Smidt M. P., O'Malley K. L., et Burbach J. P. (2000) A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem* **74**, 1829-1837.
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K. E., Corden J. L., Westphal H., Beachy, et PA. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Coates M. I. (1994) The origin of vertebrate limbs. *Dev Suppl* 169-180.
- Cooke J., Nowak M. A., Boerlijst M., et Maynard-Smith J. (1997) Evolutionary origins and maintenance of redundant gene expression during metazoan development. *Trends Genet* **13**, 360-364.
- Cossu G., Kelly R., Tajbakhsh S., Di Donna S., Vivarelli E., et Buckingham M. (1996a) Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* **122**, 429-437.
- Cossu G., Tajbakhsh S., et Buckingham M. (1996b) How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* **12**, 218-223.
- Crossley P. H., Martinez S., et Martin G. R. (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, 66-68.
- Cserjesi P., Brown D., Ligon K. L., Lyons G. E., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., et Olson E. N. (1995) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development* **121**, 1099-1110.
- Currie P. D. et Ingham P. W. (1998) The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. *Mech Dev* **73**, 3-21.
- Danielian P. S. et McMahon A. P. (1996) Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* **383**, 332-334.
- Dawson S. J., Yoon S. O., Chikaraishi D. M., Lillycrop K. A., et Latchman D. S. (1994) The Oct-2 transcription factor represses tyrosine hydroxylase expression via a heptamer TAATGARAT-like motif in the gene promoter. *Nucl Acids Res* **22**, 1023-1028.
- Desplan C., Theis J., et O'Farrell P. (1988) The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* **54**, 1081-1090.
- Desplan C., Theis J., et O'Farrell P. H. (1985) The Drosophila developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature* **318**, 630-635.
- Deutsch U., Dressler G. R., et Gruss P. (1988) Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* **53**, 617-625.

Ding Q., Motoyama J., Gasca S., Mo R., Sasaki H., Rossant J., et Hui C. C. (1998) Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development* **125**, 2533-2543.

Driever W. et Nusslein-Volhard C. (1989) The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early Drosophila embryo. *Nature* **337**, 138-143.

Drouin J., Lamolet B., Lamonerie T., Lanctôt C., et Tremblay J. J. (1998) The *Ptx* family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 31-36.

Duboule D. (1994) *Guidebook to the homeobox genes*, pp. 1-284. Sambrook & Tooze Publication, Oxford, U.K.

Dunnett S. B. et Bjorklund A. (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* **399**, A32-A39.

Dutton R., Yamada T., Turnley A., Bartlett P. F., et Murphy M. (1999) Sonic hedgehog promotes neuronal differentiation of murine spinal cord precursors and collaborates with neurotrophin 3 to induce Islet-1. *J Neurosci* **19**, 2601-2608.

Echelard Y., Epstein D. J., St Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A., et McMahon A. P. (1993) Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**, 1417-1430.

Ericson J., Briscoe J., Rashbass P., et van Heyningen V. (1997) Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *CSH Symp Quant Biol* **62**, 451-466.

Fader D. et Lewis E. J. (1990) Interaction of cyclic AMP and cell-cell contact in the control of tyrosine hydroxylase RNA. *Brain Res Molecular Brain Research*. **8**, 25-29.

Fan C. M., Porter J. A., Chiang C., Chang D. T., Beachy P. A., et Tessier-Lavigne M. (1995) Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* **81**, 457-465.

Fauquet M. et Boni C. (1993) The quail tyrosine hydroxylase gene promoter contains an active cyclic AMP-responsive element. *J Neurochem* **60**, 274-281.

Figdor M. C. et Stern C. D. (1993) Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* **363**, 630-634.

Fode C., Ma Q., Casarosa S., Ang S. L., Anderson D. J., et Guillemot F. (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* **14**, 67-80.

Fritzsche B. (1998) Evolution of the vestibulo-ocular system. *Otolaryngology - Head & Neck Surgery* **119**, 182-192.

- Funayama N., Sato Y., Matsumoto K., Ogura T., et Takahashi Y. (1999) Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* **126**, 4129-4138.
- Fung B. P., Yoon S. O., et Chikaraishi D. M. (1992) Sequences that direct rat tyrosine hydroxylase gene expression. *J Neurochem* **58**, 2044-2052.
- Gage P. J., Suh H., et Camper S. A. (1999a) The bicoid-related Pitx gene family in development. *Mam Genome* **10**, 197-200.
- Gage P. J., Suh H. Y., et Camper S. A. (1999b) Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* **126**, 4643-4651.
- Gandelman K. Y., Coker G. T., Moffat M., et O'Malley K. L. (1990) Species and regional differences in the expression of cell-type specific elements at the human and rat tyrosine hydroxylase gene loci. *J Neurochem* **55**, 2149-2152.
- Gehring W. J., Qian Y. Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier A. F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G., et Wüthrich K. (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- Gizang-Ginsberg E. et Ziff E. B. (1994) Fos family members successively occupy the tyrosine hydroxylase gene AP-1 site after nerve growth factor or epidermal growth factor stimulation and can repress transcription. *Mol Endocrinol* **8**, 249-262.
- Gonzalez A. et Smeets W. J. (1991) Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *Journal of Comparative Neurology* **303**, 457-477.
- Goulding M. D., Lumsden A., et Gruss P. (1993) Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* **117**, 1001-1016.
- Hanes S. D. et Brent R. (1989) DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* **57**, 1275-1283.
- Hanks M. C., Loomis C. A., Harris E., Tong C. X., Anson-Cartwright L., Auerbach A., et Joyner A. (1998) Drosophila engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* **125**, 4521-4530.
- Harrington M. A., Jones P. A., Imagawa M., et Karin M. (1988) Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA* **5**, 2066-2070.
- Harvey R. P. (1998) Links in the left/right axial pathway. *Cell* **94**, 273-276.
- Helms A. W. et Johnson J. E. (1998) Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Development* **125**, 919-928.

- Hemmati-Brivanlou, A. (2000) La morphogenèse du système nerveux chez les vertébrés. *Médecine/sciences* **16**, 150-158.
- Hidalgo-Sanchez M., Simeone A., et Alvarado-Mallart R. M. (1999) Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with Otx2 repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal prosencephalon. *Development* **126**, 3191-3203.
- Hirsinger E., Duprez D., Jouve C., Malapert P., Cooke J., et Pourquie O. (1997) Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development* **124**, 4605-4614.
- Hoey T. et Levine M. (1988) Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* **332**, 858-861.
- Hornby P. J., Piekut D. T., et Demski L. S. (1987) Localization of immunoreactive tyrosine hydroxylase in the goldfish brain. *Journal of Comparative Neurology* **261**, 1-14.
- Hynes M., Porter J. A., Chiang C., Chang D., Tessier-Lavigne M., Beachy P. A., et Rosenthal A. (1995b) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* **15**, 35-44.
- Hynes M., Poulsen K., Tessier-Lavigne M., et Rosenthal A. (1995a) Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell* **80**, 95-101.
- Hynes M. et Rosenthal A. (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Neurol* **9**, 26-36.
- Hynes M., Stone D. M., Dowd M., Pitts-Meek S., Goddard A., Gurney A., et Rosenthal A. (1997) Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* **19**, 15-26.
- Hynes M., Ye W., Wang K., Stone D., Murone M., Sauvage F., et Rosenthal A. (2000) The seven-transmembrane receptor smoothens cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nature Neuroscience* **3**, 41-46.
- Ikeya M., Lee S. M., Johnson J. E., McMahon A. P., et Takada S. (1997) Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**, 966-970.
- Ikeya M. et Takada S. (1998) Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. *Development* **125**, 4969-4976.
- Ishida Y., Kuwahara I., Todaka K., Hashiguchi H., Nishimori, T, et Mitsuyama Y. (1996) Dopaminergic transplants suppress L-DOPA-induced Fos expression in the dopamine-depleted striatum in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **727**, 205-211.
- Jaynes J. B. et O'Farrell P. H. (1988) Activation and repression of transcription by homeodomain-containing proteins that bind a common site. *Nature* **336**, 744-749.

- Johnson R. L., Laufer E., Riddle R. D., et Tabin C. (1994) Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* **79**, 1165-1173.
- Joyner A. L. (1996) Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet* **12**, 15-20.
- Katz L. C. et Shatz C. J. (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* **274**, 1133-1138.
- Kim K. S., Lee M. K., Carroll J., et Joh T. H. (1993) Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *J Biol Chem* **268**, 15689-15695.
- Kissinger C. R., Liu B. S., Martin-Blanco E., Kornberg T. B., et Pabo C. O. (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* **63**, 579-590.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y., et Shimizu N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- Kobayashi K., Sasaoka T., Morita S., Nagatsu I., Iguchi A., Kurosawa Y., Fujita K., Nomura T., Kimura M., et Katsuki M. (1992) Genetic alteration of catecholamine specificity in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1631-1635.
- Kornberg T. (1981) Engrailed: a gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 1095-1099.
- Krasnow M. A., Saffman E. E., Kornfeld K., et Hogness D. S. (1989) Transcriptional activation and repression by Ultrabithorax proteins in cultured *Drosophila* cells. *Cell* **57**, 1031-1043.
- Krishnan V., Pereira F. A., Qiu Y., Chen C. H., Beachy P. A., Tsai, SY, et Tsai M. J. (1997) Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase. *Science* **278**, 1947-1950.
- Kruger R., Kuhn W., Muller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schols L., et Riess O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* **18**, 106-108.
- Kumer S. C. et Vrana K. E. (1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* **67**, 443-462.
- Lamonerie T., Tremblay J. J., Lanctôt C., Therrien M., Gauthier Y., et Drouin J. (1996) PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* **10**, 1284-1295.

- Lancôt C., Gauthier Y., et Drouin J. (1999a) Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* **140**, 1416-1422.
- Lancôt C., Lamolet B., et Drouin J. (1997) The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817.
- Lancôt C., Moreau A., Chamberlet M., Tremblay M. L., et Drouin J. (1999b) Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* **126**, 1805-1810.
- Lang A. E. et Lozano A. M. (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339**, 1044-1053.
- Laughon A. et Scott M. P. (1984) Sequence of a *Drosophila* segmentation gene: protein structure homology with DNA-binding proteins. *Nature* **310**, 25-31.
- Lazaroff M., Patankar S., Yoon S. O., et Chikaraishi D. M. (1995) The cyclic AMP response element directs tyrosine hydroxylase expression in catecholaminergic central and peripheral nervous system cell lines from transgenic mice. *J Biol Chem* **270**, 21579-21589.
- Le Douarin N. (1982) *The Neural Crest*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Le W., Conneely O. M., He Y., Jankovic J., et Appel S. H. (1999a) Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem* **73**, 2218-2221.
- Le W., Conneely O. M., Zou L., He Y., Saucedo-Cardenas O., Jankovic J., Mosier, DR, et Appel S. H. (1999b) Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Experimental Neurology* **159**, 451-458.
- Lee J., Platt K. A., Censullo P., et Altaba A. (1997b) Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**, 2537-2552.
- Lee K. J., Dietrich P., et Jessell T. M. (2000a) Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* **403**, 734-740.
- Lee K. J. et Jessell T. M. (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **22**, 261-294.
- Lee K. J., Mendelsohn M., et Jessell T. M. (1998) Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev* **12**, 3394-3407.
- Lee, M. S. Y. (1997) The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B* **352**, 53-91.

- Lee S. H., Lumelsky N., Studer L., Auerbach J. M., et McKay R. D. (2000b) Efficient generation of midbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Neuroscience* **18**, 675-679.
- Lee S. M., Danielian P. S., Fritsch B., et McMahon A. P. (1997a) Evidence that FGF8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing midbrain. *Development* **124**, 959-969.
- Lewis E. J. et Chikaraishi D. M. (1987) Regulated expression of the tyrosine hydroxylase gene by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **7**, 3332-3336.
- Lewis E. J., Harrington C. A., et Chikaraishi D. M. (1987) Transcriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene by glucocorticoid and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 3550-3554.
- Li S. D. et Joyner A. L. (2000) Two Pax2/5/8-binding sites in Engrailed2 are required for proper initiation of endogenous mid-hindbrain expression. *Mech Dev* **90**, 155-165.
- Liem K. F., Jr., Tremml G., et Jessell T. M. (1997) A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-138.
- Liem K. F., Jr., Tremml G., Roelink H., et Jessell T. M. (1995) Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979.
- Liu A., Losos K., et Joyner A. L. (1999) FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development* **126**, 4827-4838.
- Liu J., Merlie J. P., Todd R. D., et O'Malley K. L. (1997) Identification of cell type-specific promoter elements associated with the rat tyrosine hydroxylase gene using transgenic founder analysis. *Brain Res Mol Brain Res* **50**, 33-42.
- Logan M., Pagán-Westphal S. M., Smith D. M., Paganessi L., et Tabin C. J. (1998) The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**, 307-317.
- Loomis C. A., Harris E., Michaud J., Wurst W., Hanks M., et Joyner A. L. (1996) The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**, 360-363.
- Lumsden A. et Krumlauf R. (1996) Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-1115.
- Maire, P. et Spitz, F. (1997) Muscles de la tête, muscles des jambes et muscles du tronc, demandez le programme myogénique! *Médecine/sciences* **13**, 1182-1186.
- Mansouri A. et Gruss P. (1998) Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord. *Mech Dev* **78**, 171-178.
- Marcelle C., Stark M. R., et Bronner-Fraser M. (1997) Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite. *Development* **124**, 3955-3963.

- Maroto M., Reshef R., Munsterberg A. E., Koester S., Goulding M., et Lassar A. B. (1997) Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* **89**, 139-148.
- Marti E., Bumcrot D. A., Takada R., et McMahon A. P. (1995) Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* **375**, 322-325.
- Martinez-Morales J. R., Barbas J. A., Marti E., Bovolenta P., Edgar D., et Rodriguez-Tebar A. (1997) Vitronectin is expressed in the ventral region of the neural tube and promotes the differentiation of motor neurons. *Development* **124**, 5139-5147.
- Martinez S., Crossley P. H., Cobos I., Rubenstein J. L., Martin, et GR. (1999) FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* **126**, 1189-1200.
- Matise M. P., Epstein D. J., Park H. L., Platt K. A., et Joyner A. L. (1998) Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-2770.
- McGinnis W., Garber R. L., Wirz J., Kuroiwa A., et Gehring W. J. (1984) A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* **37**, 403-408.
- McMahon A. P. et Bradley A. (1990) The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.
- McMahon A. P., Joyner A. L., Bradley A., et McMahon J. A. (1992) The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* **69**, 581-595.
- McMahon J. A., Takada S., Zimmerman L. B., Fan C. M., Harland R. M., et McMahon A. P. (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-1452.
- Meek J., Joosten H. W., et Steinbusch H. W. (1989) Distribution of dopamine immunoreactivity in the brain of the mormyrid teleost *Gnathonemus petersii*. *Journal of Comparative Neurology* **281**, 362-383.
- Millen K. J., Wurst W., Herrup K., et Joyner A. L. (1994) Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development* **120**, 695-706.
- Millet S., Campbell K., Epstein D. J., Losos K., Harris E., et Joyner A. L. (1999) A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161-164.

- Min N., Joh T. H., Kim K. S., Peng C., et Son J. H. (1994) 5' upstream DNA sequence of the rat tyrosine hydroxylase gene directs high-level and tissue-specific expression to catecholaminergic neurons in the central nervous system of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 281-289.
- Morgan W. W., Walter C. A., Windle J. J., et Sharp Z. D. (1996) 3.6 kb of the 5' flanking DNA activates the mouse tyrosine hydroxylase gene promoter without catecholaminergic-specific expression. *J Neurochem* **66**, 20-25.
- Nagamoto-Combs K., Piech K. M., Best J. A., Sun, B, et Tank A. W. (1997) Tyrosine hydroxylase gene promoter activity is regulated by both cyclic AMP-responsive element and AP1 sites following calcium influx. Evidence for cyclic amp-responsive element binding protein-independent regulation. *J Biol Chem* **272**, 6051-6058.
- Niss K. et Leutz A. (1998) Expression of the homeobox gene GBX2 during chicken development. *Mech Dev* **76**, 151-155.
- Noden D. M., Marcucio R., Borycki A. G., et Emerson C. P., Jr. (1999) Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev Dynamics* **216**, 96-112.
- Pabst O., Herbrand H., et Arnold H. H. (1998) Nkx2-9 is a novel homeobox transcription factor which demarcates ventral domains in the developing mouse CNS. *Mech Dev* **73**, 85-93.
- Papanikolaou N. A. et Sabban E. L. (1999) Sp1/Egr1 motif: a new candidate in the regulation of rat tyrosine hydroxylase gene transcription by immobilization stress. *J Neurochem* **73**, 433-436.
- Papanikolaou, N. A. et Sabban, E. L. Ability of Egr1 to activate tyrosine hydroxylase transcription in PC12 cells: cross-talk with AP-1 factors. *Journal of Biological Chemistry* (Baltimore) in press. 2000.
- Pfaff S. L., Mendelsohn M., Stewart C. L., Edlund T., Jessell, et TM. (1996) Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* **84**, 309-320.
- Pfeffer P. L., Bouchard M., et Busslinger M. (2000) Pax2 and homeodomain proteins cooperatively regulate a 435 bp enhancer of the mouse Pax5 gene at the midbrain-hindbrain boundary. *Development* **127**, 1017-1028.
- Piedra M. E., Icardo J. M., Albajar M., Rodriguez-Rey J. C., et Ros M. A. (1998) Pitx2 participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* **94**, 319-324.
- Pierani A., Brenner-Morton S., Chiang C., et Jessell T. M. (1999) A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* **97**, 903-915.
- Placzek M., Jessell T. M., et Dodd J. (1993) Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development* **117**, 205-218.

- Placzek M., Tessier-Lavigne M., Yamada T., Jessell T., et Dodd J. (1990) Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* **250**, 985-988.
- Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I., et Nussbaum R. L. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045-2047.
- Pons S. et Marti E. (2000) Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation. *Development* **127**, 333-342.
- Porter J. A., von Kessler D. P., Ekker S. C., Young K. E., Lee J. J., Moses K., et Beachy P. A. (1995) The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* **374**, 363-366.
- Poulin G., Lebel M., Chamberland M., Paradis F. W., et Drouin J. (2000) Specific protein:protein interaction between basic Helix-Loop-Helix transcription factors and homeoproteins of the Pitx family. *Mol Cell Biol* **20**, 4826-4837.
- Price M., Lazzaro D., Pohl T., Mattei M. G., Ruther U., Olivo J. C., Duboule D., et Di Lauro R. (1992) Regional expression of the homeobox gene Nkx-2.2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron* **8**, 241-255.
- Puelles L. et Rubenstein J. L. R. (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci* **16**, 472-479.
- Qian Y. Q., Billeter M., Otting G., Muller M., Gehring W. J., et Wuthrich K. (1989) The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* **59**, 573-580.
- Qiu M., Shimamura K., Sussel L., Chen S., et Rubenstein J. L. (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* **72**, 77-88.
- Raynaud A. et Adrian M. (1975) [Demonstration, by means of electron microscopy, of the penetration of somitic cells into the mesoblast of the limb buds of reptile embryos (*Anguis fragilis*, *Lacerta viridis*)]. [French]. *Archives d Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale* **64**, 287-316.
- Reshef R., Maroto M., et Lassar A. B. (1998) Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev* **12**, 290-303.

- Roberts B. L., Meredith G. E., et Maslam S. (1989) Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Anat Embryol (Berl)* **180**, 401-412.
- Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V., Norlin S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe Y., Placzek M., Edlund T., et Jessell T. M. (1994) Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**, 761-775.
- Roelink H., Porter J. A., Chiang C., Tanabe Y., Chang D. T., Beachy P. A., et Jessell T. M. (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-455.
- Rosenthal A. (1998) Auto transplants for Parkinson's disease? *Neuron* **20**, 169-172.
- Rubenstein J. L. R., Martinez S., Shimamura K., et Puelles L. (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* **266**, 578-580.
- Ryan A. K., Blumberg B., Rodriguez-Esteban C., Yonei-Tamura S., Tamura I., Tsukui T., de la Peña J., Sabbagh W., Greenwald J., Choe S., Norris D. P., Robertson E. J., Evans R. M., Rosenfeld M. G., et Izpisua Belmonte J. C. (1998) Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-551.
- Sakurada K., Ohshima-Sakurada M., Palmer T. D., et Gage F. H. (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* **126**, 4017-4026.
- Sasai Y. et De Robertis E. M. (1997) Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol* **182**, 5-20.
- Saucedo-Cardenas O., Quintana-Hau J. D., Le W. D., Smidt M. P., Cox J. J., DeMayo F., Burbach J. P. H., et Conneely O. M. (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4013-4018.
- Schimmel J. J., Crews L., Roffler-Tarlov S., et Chikaraishi D. M. (1999) 4.5 kb of the rat tyrosine hydroxylase 5' flanking sequence directs tissue specific expression during development and contains consensus sites for multiple transcription factors. *Brain Res Mol Brain Res* **74**, 1-14.
- Schweickert A., Campione M., Steinbeisser H., et Blum M. (2000) Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev* **90**, 41-51.
- Semina E. V., Ferrell R. E., Mintz-Hittner H. A., Bitoun P., Alward W. L. M., Reiter R. S., Funkhauser C., Daack-Hirsch S., et Murray J. C. (1998) A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nature Genetics* **19**, 167-170.

Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., et Hrstka, R. F. Graw J. Deletion in the promoter region and altered expression of *pitx3* homeobox gene in aphakia mice. *Human Molecular Genetics* 9[11], 1575-1585. 2000.

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

Shamim A., Pelzer T., Grohe C., et Neyses L. (1999) Induction of *Egr-1* mRNA and protein by endothelin 1, angiotensin II and norepinephrine in neonatal cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* **195**, 11-17.

Shepherd J. C., McGinnis W., Carrasco A. E., De, Robertis E. M., et Gehring W. J. (1984) Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* **310**, 70-71.

Simeone A., Acampora D., Mallamaci A., Stornaiuolo A., D'Apice M. R., Nigro V., et Boncinelli E. (1993) A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J* **12**, 2735-2747.

Simon H., Hornbruch A., et Lumsden A. (1995) Independent assignment of antero-posterior and dorso-ventral positional values in the developing chick hindbrain. *Curr Biol* **5**, 205-214.

Smidt M., van Schaick H. S. A., Lanctôt C., Tremblay J. J., Cox J. J., van der Kleij A. A. M., Wolterink G., Drouin J., et Burbach P. H. (1997) A homeodomain gene *PTX3* has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13305-13310.

Smidt M. P., Asbreuk C. H., Cox J. J., Chen H., et Johnson R. L. (2000a) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nature Neuroscience* **3**, 337-341.

Smidt M. P., Asbreuk C. H., Cox J. J., Chen H., Johnson R. L., et Burbach J. P. (2000b) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. *Nature Neuroscience* **3**, 337-341.

Song D. L., Chalepakis G., Gruss P., et Joyner A. L. (1996) Two Pax-binding sites are required for early embryonic brain expression of an *Engrailed-2* transgene. *Development* **122**, 627-635.

Stern H. M., Brown A. M., et Hauschka S. D. (1995) Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing *Wnt-1*. *Development* **121**, 3675-3686.

Sun X., Meyers E. N., Lewandoski M., et Martin G. R. (1999) Targeted disruption of *Fgf8* causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* **13**, 1834-1846.

Swanson D. J., Adachi M., et Lewis E. J. (2000) The homeodomain protein Arix promotes protein kinase A-dependent activation of the dopamine beta-hydroxylase promoter through multiple elements and interaction with the coactivator cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* **275**, 2911-2923.

Swanson D. J., Zellmer E., et Lewis E. J. (1997) The homeodomain protein Arix interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Biol Chem* **272**, 27382-27392.

Swanson D. J., Zellmer E., et Lewis E. J. (1998) AP1 proteins mediate the cAMP response of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Biol Chem* **273**, 24065-24074.

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

Szeto D. P., Ryan A. K., O'Connell S. M., et Rosenfeld M. G. (1996) P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7706-7710.

Tajbakhsh S. et Cossu G. (1997) Establishing myogenic identity during somitogenesis. *Curr Genetics Dev* **7**, 634-641.

Tanabe Y. et Jessell T. M. (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* **274**, 1115-1123.

Tanabe Y., William C., et Jessell T. M. (1998) Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95**, 67-80.

Tear G. (1999) Neuronal guidance. A genetic perspective. *Trends Genet* **15**, 113-118.

Tessier-Lavigne M. et Goodman C. S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.

Thomas K. R. et Capecchi M. R. (1990) Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* **346**, 847-850.

Thomas S. A., Matsumoto A. M., et Palmiter R. D. (1995) Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* **374**, 643-646.

Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., et Jones J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.

- Tinti C., Conti B., Cubells J. F., Kim K. S., Baker H., et Joh T. H. (1996) Inducible cAMP early repressor can modulate tyrosine hydroxylase gene expression after stimulation of cAMP synthesis. *J Biol Chem* **271**, 25375-25381.
- Tinti C., Yang C., Seo H., Conti B., Kim C., Joh T. H., Kim, et KS. (1997) Structure/function relationship of the cAMP response element in tyrosine hydroxylase gene transcription. *J Biol Chem* **272**, 19158-19164.
- Treisman J., Gonczy P., Vashishtha M., Harris E., et Desplan C. (1989) A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* **59**, 553-562.
- Tremblay J. J. et Drouin J. (1999) Egr-1 is a downstream effector of GnRH and synergizes by direct interaction with Ptx1 and SF-1 to enhance luteinizing hormone b gene transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 2567-2576.
- Tremblay J. J., Goodyer C. G., et Drouin J. (2000) Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinol* **71**, 277-286.
- Tremblay J. J., Lanctôt C., et Drouin J. (1998) The pan-pituitary activator of transcription, Ptx-1 (pituitary homeobox1), acts in synergy with SF-1 and Pit1 and is an upstream regulator of the Lim-homeodomain gene Lim3/Lhx3. *Mol Endocrinol* **12**, 428-441.
- Tremblay J. J., Marcil A., Gauthier Y., et Drouin J. (1999) Ptx1 regulates SF-1 activity by an interaction that mimics the role of the ligand-binding domain. *EMBO J* **18**, 3431-3441.
- Trocme C., Sarkis C., Hermel J. M., Duchateau R., Harrison S., Simonneau M., Al Shawi R., et Mallet J. (1998) CRE and TRE sequences of the rat tyrosine hydroxylase promoter are required for TH basal expression in adult mice but not in embryo. *Eur J Neurosci* **10**, 508-521.
- Tsuchida T., Ensini M., Morton S. B., Baldassare M., Edlund T., Jessell T. M., et Pfaff S. L. (1994) Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* **79**, 957-970.
- von Bubnoff A., Schmidt J. E., et Kimelman D. (1996) The *Xenopus laevis* homeobox gene Xgbx-2 is an early marker of anteroposterior patterning in the ectoderm. *Mech Dev* **54**, 149-160.
- Vorbruggen G., Constien R., Zilian O., Wimmer E. A., Dowe G., Taubert H., Noll M., et Jackle H. (1997) Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*. *Mech Dev* **68**, 139-147.
- Wagner J., Akerud P., Castro D. S., Holm P. C., Canals J. M., Snyder E. Y., Perlmann T., et Arenas E. (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotechnology* **17**, 653-659.

- Wallen a., Zetterstrom R. H., Solomin L., Arvidsson M., Olson L., et Perlmann T. (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* **253**, 737-746.
- Wang M. Z., Jin P., Bumcrot D. A., Marigo V., McMahon A. P., Wang E. A., Woolf T., et Pang K. (1995) Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nature Medicine* **1**, 1184-1188.
- Wassarman K. M., Lewandoski M., Campbell K., Joyner A. L., Rubenstein J. L., Martinez S., et Martin G. R. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development* **124**, 2923-2934.
- Weir M. P. et Kornberg T. (1985) Patterns of engrailed and fushi tarazu transcripts reveal novel intermediate stages in Drosophila segmentation. *Nature* **318**, 433-439.
- Wicht H. et Himstedt W. (1988) Topologic and connectional analysis of the dorsal thalamus of Triturus alpestris (amphibia, urodela, salamandridae). *Journal of Comparative Neurology* **267**, 545-561.
- Wilson D., Sheng G., Lecuit T., Dostatni N., et Desplan C. (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* **7**, 2120-2134.
- Wilson D. S., Sheng G., Jun S., et Desplan C. (1996) Conservation and diversification in homeodomain-dna interactions: a comparative genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6886-6891.
- Winslow G. M., Hayashi S., Krasnow M., Hogness D. S., et Scott M. P. (1989) Transcriptional activation by the Antennapedia and fushi tarazu proteins in cultured Drosophila cells. *Cell* **57**, 1017-1030.
- Wolberger C., Vershon A. K., Liu B., Johnson A. D., et Pabo C. O. (1991) Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**, 517-528.
- Wong S. C., Moffat M. A., et O'Malley K. L. (1994) Sequences distal to the AP1/E box motif are involved in the cell type-specific expression of the rat tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* **62**, 1691-1697.
- Wurst W., Auerbach A. B., et Joyner A. L. (1994) Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, 2065-2075.
- Yamada T., Pfaff S. L., Edlund T., et Jessell T. M. (1993) Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell* **73**, 673-686.

- Yamada T., Placzek M., Tanaka H., Dodd J., et Jessell T. M. (1991) Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* **64**, 635-647.
- Yang C., Kim H. S., Seo H., et Kim K. S. (1998) Identification and characterization of potential cis-regulatory elements governing transcriptional activation of the rat tyrosine hydroxylase gene. *J Neurochem* **71**, 1358-1368.
- Ye W., Shimamura K., Rubenstein J. L., Hynes M. A., et Rosenthal A. (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell* **93**, 755-766.
- Yoon S. O. et Chikaraishi D. M. (1992) Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron* **9**, 55-67.
- Yoon S. O. et Chikaraishi D. M. (1994) Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *J Biol Chem* **269**, 18453-18462.
- Yoshida M., Nagatsu I., Kawakami-Kondo Y., Karasawa N., Spatz M., et Nagatsu T. (1983) Monoaminergic neurons in the brain of goldfish as observed by immunohistochemical techniques. *Experientia* **39**, 1171-1174.
- Yoshioka H., Meno C., Koshiba K., Sugihara M., Itoh H., Ishimaru Y., Inoue T., Ohuchi H., Semina E. V., Murray J. C., Hamada H., et Noji S. (1998) Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* **94**, 299-305.
- Zellmer E., Zhang Z., Greco D., Rhodes J., Cassel S., et Lewis E. J. (1995) A hemeodomain protein selectively expressed in noradrenergic tissue regulates transcription of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Neurosci* **15**, 8109-8120.
- Zetterstrom R. H., Solomin L., Jansson L., Hoffer B. J., Olson L., et Perlmann T. (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* **276**, 248-250.
- Zetterstrom R. H., Williams R., Perlmann T., et Olson L. (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* **41**, 111-120.
- Zhou Q. Y. et Palmiter R. D. (1995) Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* **83**, 1197-1209.
- Zhou Q. Y., Quaipe C. J., et Palmiter R. D. (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* **374**, 640-643.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Jacques Drouin d'avoir accepté d'accueillir une fille dans son laboratoire à l'été 1997 en tant que stagiaire d'été. Merci aussi aux gars du lab. d'avoir si bien su m'endurer cet été-là, si bien que j'ai voulu revenir au printemps 1998 pour débiter mon projet de maîtrise. Je me dois donc de remercier encore une fois le Dr Jacques Drouin d'avoir bien voulu m'accueillir à nouveau et d'avoir été un directeur tout-de-même présent et attentif bien que très occupé. Merci aussi à mon co-directeur, Dr Alain Moreau, pour sa générosité et sa grande disponibilité.

Comme quoi tout vient à point à qui sait attendre (et travailler fort), je me dois de remercier l'IRCM et le FCAR-FRSQ de m'avoir tous deux octroyé une bourse d'étude pour ma dernière session à la maîtrise.

La science aura beau être une discipline sérieuse, le travail scientifique se fait au jour le jour avec des gens tout-à-fait humains (et pas toujours sérieux...) autour de soi. Merci donc à mes collègues pour les conseils de tout ordre, les encouragements et même les réconforts qu'ils m'ont gentiment apportés au cours de ces années. Merci pour l'ambiance colorée du labo., les moments complètement fous et tout ce qui fait que je quitte ce milieu si particulier le coeur un peu lourd. Finalement un merci tout spécial à ma mère qui a su, surtout par son exemple, m'enseigner le courage dans l'adversité.

Montréal, 26 août 2000