

Université de Montréal

Le rôle de l'acide rétinoïque dans l'établissement de l'axe gauche-droite  
chez la souris

par

Sylwia Wasiak

**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 1999

©Sylwia Wasiak, 1999



QH  
506  
U54  
2000  
V.001



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Le rôle de l'acide rétinoïque dans l'établissement de l'axe gauche-droite  
chez la souris

présenté par

Sylwia Wasiak

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:**

Jacques Drouin, Ph.D.

---

Edward W. Bradley, Ph.D.

---

David Lohnes, Ph.D.

---

Mémoire accepté le:

---

## SOMMAIRE

La détermination précoce de l'asymétrie gauche-droite chez les vertébrés dépend de la transduction, de la propagation et du maintien de plusieurs signaux intra- et extracellulaires incluant des membres de la superfamille TGF $\beta$  (*lefty-1*, *lefty-2*, *nodal*) et des facteurs de transcription (*pitx-2*). L'inflexion du tube cardiaque vers la droite, le premier marqueur morphologique de l'asymétrie gauche-droite chez l'embryon de souris, peut être perturbé par l'excès ou l'insuffisance d'acide rétinoïque (AR), le métabolite actif de la vitamine A. Notamment, le *situs inversus* est observé chez 65% des embryons de caille déficients en vitamine A et 50% des embryons de rat ayant un *situs* anormal suite à l'exposition avec l'AR lors de la gastrulation. Ces observations suggèrent que l'AR est une composante de la voie de signalisation établissant la latéralité chez la souris.

Notre travail démontre que des doses pharmacologiques d'AR, en plus d'affecter la latéralité cardiaque, influencent l'expression des gènes impliqués dans le développement de l'axe gauche-droite chez la souris. Suivant le traitement avec l'AR, l'expression de *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* et *pitx-2* est non seulement augmentée dans les cellules de carcinome embryonnaire murin F9, mais aussi elle devient bilatérale dans la lame latérale de l'embryon au stade 8,0. Ce domaine d'expression ectopique semble restreint à la région postérieure de l'embryon et son étendue varie selon le temps d'exposition à l'AR. De plus, l'expression de *brachyury*, un marqueur du mésoderme postérieur, est considérablement diminuée par le traitement. Se basant sur ces observations, nous avançons l'hypothèse que l'effet d'un excès d'AR se situe au niveau du mésoderme naissant. Somme toute, notre travail suggère que les rétinoïdes influencent des événements précoces cruciaux pour l'établissement de l'axe gauche-droite.

## TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY .....	ii
SOMMAIRE .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
<b>1 L'ASYMÉTRIE GAUCHE-DROITE DES VERTÉBRÉS: INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>2 LES ANOMALIES DU DÉVELOPPEMENT DE L'AXE GAUCHE-DROITE .....</b>	<b>3</b>
2.1 Les manifestations cliniques de l'hétérotaxie.....	3
2.2 Les défauts de latéralité chez l'homme. ....	4
2.3 L'épidémiologie.....	5
<b>3 LE DÉVELOPPEMENT DE L'AXE GAUCHE-DROITE CHEZ L'EMBRYON .....</b>	<b>5</b>
3.1 La première étape: bris de la symétrie.....	7
3.1.1 <i>L'origine de l'axe gauche-droite</i> .....	7
3.1.2 <i>L'orientation spatiale de l'axe gauche-droite</i> .....	8
3.1.3 <i>Les dynéines et l'axe gauche-droite</i> .....	9
3.2 La deuxième étape: propagation de latéralité.....	10
3.2.1 <i>L'expression asymétrique des gènes</i> .....	10
3.2.2 <i>Les structures médianes et la latéralité</i> .....	15
3.2.3 <i>La corrélation entre l'expression asymétrique des gènes et le situs</i> .16	

3.3 La troisième étape: instruction des organes en formation .....	17
<b>4 LA VITAMINE A ET SES DÉRIVÉS: INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>5 LA SIGNALISATION PAR LES RÉTINOÏDES .....</b>	<b>19</b>
5.1 Le métabolisme de l'acide rétinoïque .....	20
5.2 Les récepteurs de l'acide rétinoïque .....	22
5.2.1 Les RAR et les RXR .....	22
5.2.2 La structure des récepteurs de l'acide rétinoïque .....	23
5.2.3 La liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque au ligand et à l'ADN .....	26
5.2.4 L'activation de la transcription par des récepteurs de l'acide rétinoïque .....	27
5.2.5 La 'modulation croisée' .....	31
<b>6 LE RÔLE DES RÉTINOÏDES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT .....</b>	<b>32</b>
6.1 L'insuffisance et l'excès d'acide rétinoïque .....	32
6.2 La différenciation des cellules F9 <i>in vitro</i> .....	35
6.3 L'invalidation génique des RAR et des RXR chez la souris .....	36
6.4 La redondance fonctionnelle .....	38
<b>7 LE RÔLE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA LATÉRALITÉ CHEZ L'EMBRYON .....</b>	<b>39</b>
<b>8 OBJECTIF DU TRAVAIL .....</b>	<b>41</b>
<b>PRÉSENTATION DU MANUSCRIPT .....</b>	<b>42</b>
<b>TITLE: RETINOIC ACID AFFECTS LEFT-RIGHT PATTERNING .....</b>	<b>43</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>44</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>45</b>

<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>49</b>
Animals and Treatment .....	49
In situ hybridization analysis .....	49
Cell Culture and Northern Blot Analysis .....	50
<b>RESULTS</b> .....	<b>51</b>
RA affects looping of the heart tube .....	51
RA induces the expression of genes implicated in the laterality pathway in F9 cells .....	52
RA induces bilateral expression of left-sided markers in the mouse embryo	52
RA treatment affects midline markers.....	55
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>57</b>
Potential mechanisms of RA function in aberrant L-R patterning .....	58
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>62</b>
<b>FIGURE LEGENDS</b> .....	<b>69</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>76</b>
<b>1 LA FENÊTRE DE DÉVELOPPEMENT CIBLÉE PAR L'AR</b> .....	<b>78</b>
<b>2 L'AR ET LA PERTURBATION DE L'AXE GAUCHE-DROITE</b> .....	<b>79</b>
<b>3 LE MÉSODERME NAISSANT: UNE CIBLE POTENTIELLE DE L'AR</b> .....	<b>82</b>
<b>4 CONCLUSION</b> .....	<b>84</b>

**BIBLIOGRAPHIE.....86**

**REMERCIEMENTS.....102**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> La voie de signalisation gauche-droite.....	14
<b>Figure 2</b> Les récepteurs de l'acide rétinoïque: structure et fonction.....	25
<b>Figure 3</b> Morphology of heart tube looping following RA treatment.....	71
<b>Figure 4</b> Northern blot analysis of <i>lefty-1</i> , <i>lefty-2</i> , <i>nodal</i> and <i>pitx-2</i> expression in murine F9 embryonal carcinoma cells .....	72
<b>Figure 5</b> Effect of RA on <i>lefty-2</i> , <i>nodal</i> and <i>pitx-2</i> expression <i>in vivo</i> .....	73
<b>Figure 6</b> RA does not affect the expression of <i>lefty-1</i> in the prospective floorplate.....	74
<b>Figure 7</b> Effects of RA treatment on the midline markers.....	75

## LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

(c)ActRIIA	(chick) activin receptor type IIA
(c)ActRIIB	(chick) activin receptor type IIB
ACTR	activator of the thyroid and retinoic acid receptors
AF	activation function
AIB1	amplified in breast cancer 1
AP-1	activator protein 1
AR	acide rétinoïque
ARNm	ARN messenger
BMP	bone morphogenic protein
cAMP	cyclic AMP
CBP	cAMP response element binding protein (CREB)-binding protein
CDK	cyclin-dependant kinase
CREB	cAMP response element binding protein
cSnR-1	chick snail-related 1
DD	domaine de dimérisation
DLA	domaine de liaison à l'ADN
DLL	domaine de liaison au ligand
DR	direct repeats
DVA	déficient en vitamine A
<i>flh</i>	<i>floating head</i>
<i>Ft</i>	<i>Fused toes</i>
FXR	farnesoid X receptor
Grip1	glucocorticoid receptor-interacting protein 1
HDAC	histone deacetylase
<i>inv</i>	<i>inversion of embryonic turning</i>
<i>iv</i>	<i>inversus viscerum</i>
jpc	jours post-coitum

Ird	left-right dynein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
N-CoA	nuclear receptor coactivator
N-CoR	nuclear receptor corepressor
<i>nt</i>	<i>no turning</i>
<i>ntl</i>	<i>no tail</i>
P/CAF	p300/CBP-interacting protein
p/CIP	p300/CBP co-integrator associate protein
P450RAI	P450 retinoic acid-inductible
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptors
ptc	patched
Pu	purine
raldh-2	retinaldehyde dehydrogenase type 2
RAR	retinoic acid receptor
RARE	retinoic acid response element
RHT	récepteur de l'hormone thyroïdienne
RXR	retinoid X receptor
shh	sonic hedgehog
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
SRC-1	steroid receptor coactivator 1
TAF	TATA-binding protein (TBP)-associated factor
TBP	TATA-binding protein
TF	transcription factor
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TIF	transcription intermediary factor

CHAPITRE 1

**INTRODUCTION**

## 1 L'ASYMÉTRIE GAUCHE-DROITE DES VERTÉBRÉS: INTRODUCTION

Le corps des vertébrés, quoique généralement caractérisé par une symétrie bilatérale externe, montre une flagrante asymétrie interne. Chez les individus normaux, l'axe gauche-droite est orienté de façon à ce que l'apex du coeur pointe vers la gauche, la boucle de l'aorte soit orientée vers la droite et la veine cave inférieure soit située à gauche de la colonne vertébrale. De plus, le poumon droit est subdivisé en trois lobes tandis que le poumon gauche n'en possède que deux. Dans la cavité abdominale, l'estomac et la rate sont placés à gauche, le foie se retrouve à droite et l'intestin va de la droite vers la gauche.

Chez différents organismes, divers types de symétrie sont observés, y incluant la symétrie sphérique (volvox), radiale (étoile de mer), chirale (escargot), bilatérale (drosophile) et pseudobilatérale (homme). Dans un contexte évolutionniste, il n'est pas clair encore si cette asymétrie ou cette chiralité constituent une adaptation d'une symétrie primitive ou, inversement, si la symétrie bilatérale émerge d'une asymétrie préexistante. Dans un cas comme dans l'autre, la longue liste d'organes asymétriques présents chez les vertébrés indique que l'asymétrie est apparue en réponse à un besoin bien précis, propre aux vertébrés. Ce besoin semble être avant tout physiologique. Premièrement, l'asymétrie gauche-droite du coeur et du système circulatoire permet de générer deux systèmes de pompes à l'intérieur d'une seule structure et, par conséquent, d'en augmenter l'efficacité fonctionnelle. Deuxièmement, l'asymétrie gauche-droite permet une organisation compacte et balancée des organes dans les cavités du corps, comme le démontre l'arrangement de différentes composantes de la voie gastro-intestinale (Levin et Mercola, 1998).

## 2 LES ANOMALIES DU DÉVELOPPEMENT DE L'AXE GAUCHE-DROITE

Les perturbations génétiques du processus d'établissement de l'axe gauche-droite chez l'embryon se manifestent par plusieurs types d'anomalies. Tout d'abord, l'inversion de tous les organes du corps est appelée *situs inversus totalis*, et elle constitue l'image-miroir d'un arrangement d'organes normal appelé *situs solitus*. Ce type de malformation est parfaitement inoffensif et il n'est associé à aucun symptôme clinique. Une orientation indépendante et aléatoire de tous les organes est qualifiée d'hétérotaxie. Enfin, on distingue des cas de symétrie bilatérale (ou manque d'asymétrie), d'hétérotaxie 'isolée' (position inversée d'un organe isolé) ou d'isomérisme (duplication de l'identité gauche ou droite). Ces dernières perturbations sont accompagnées de graves symptômes cliniques, souvent fatals sans intervention chirurgicale (Casey, 1998).

### 2.1 Les manifestations cliniques de l'hétérotaxie

L'hétérotaxie décrit l'arrangement gauche-droite anormal de différents organes. Toutes les structures ayant une asymétrie gauche-droite peuvent être morphologiquement normales ou anormales, inversées ou pas et ce, indépendamment les unes des autres. Dans le compartiment thoracique, le coeur semble être un organe extrêmement sensible aux perturbations de l'axe gauche-droite. Entre autres, on observe différentes combinaisons des anomalies suivantes: persistance du sinus veineux ou du canal auriculo-ventriculaire, isomérisme des oreillettes, oreillette commune, transposition des gros vaisseaux et tétralogie de Fallot. L'anatomie de chaque poumon peut être celle d'un poumon gauche ou d'un poumon droit. Dans l'abdomen, on peut observer des défauts de rotation gastro-intestinale, une position anormale de la rate, plusieurs rates ou aucune. Le foie se retrouve souvent au milieu ou la taille relative de ses deux lobes est inversée. De plus, il existe des anomalies dont le lien avec des défauts de latéralité est plus subtil et souvent négligé. Celles-ci incluent des anomalies de

l'intestin postérieur (atrésie ou sténose anale) et du système urinaire (agénésie ou hypoplasie rénale, malformations de l'uretère) (Casey, 1998).

## 2.2 Les défauts de latéralité chez l'homme

Chez l'humain, il existe plusieurs syndromes caractérisés par des défauts de latéralité. Le *situs inversus totalis* est une anomalie très rare, touchant un individu sur 20 000. Cependant, comme cet état ne présente aucun inconvénient pour les individus atteints, on croit que ce nombre est sous-estimé (Casey, 1998).

Le syndrome de Kartagener est caractérisé par l'immobilité des cils ainsi que par le *situs inversus* (Afzelius, 1976). Les patients souffrent d'infections chroniques des voies respiratoires et de l'oreille, d'absence ou de diminution de l'odorat ainsi que d'infertilité (chez les hommes). L'absence ou l'anomalie des bras de dynéine, une protéine motrice associée aux microtubules, est à l'origine de ce problème (Afzelius, 1985). Uniquement 50% d'individus atteints du syndrome de Kartagener présentent le *situs inversus*, tandis que les autres possèdent un arrangement d'organes normal.

Le syndrome de Ivemark se manifeste soit par l'isomérisme droit, soit par l'isomérisme gauche. L'isomérisme droit est caractérisé par des poumons trilobés, deux bronches courtes, deux oreillettes droites ainsi que l'absence ou l'hypoplasie de la rate. L'isomérisme gauche, quant à lui, est caractérisé par des poumons bilobés, deux bronches longues, deux oreillettes gauches et des rates multiples. L'origine de ce défaut congénital n'est pas encore connue (Payne *et al.*, 1995).

De plus, plusieurs cas d'hétérotaxie familiale de nature autosomale dominante, récessive ou liée au chromosome X ont été répertoriés (revue par Casey, 1998; Payne *et al.*, 1995). Les individus atteints montrent des combinaisons variables de malformations complexes du coeur, des poumons, de

la rate ainsi qu'une rotation gastro-intestinale anormale. Des mutations dans *ZIC3*, un facteur de transcription à doigts de zinc, ainsi que dans *NODAL*, un membre de la superfamille TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) ont été identifiés chez certains patients atteints de l'hétérotaxie, ce qui suggère que ces gènes jouent un rôle dans le développement précoce de l'axe gauche-droite chez l'humain (Gebbia *et al.*, 1997).

### 2.3 L'épidémiologie

Il a été estimé que le *situs inversus* apparaît à une fréquence de 1/8000 à 1/25 000 naissances, 1/4 ou 1/5 des cas étant associés avec le syndrome des cils immobiles. Ces chiffres sous-estiment probablement la vraie fréquence du *situs inversus* car ce dernier constitue un image-miroir d'un arrangement d'organes normal et, par conséquent, ne se manifeste par aucun symptôme clinique. La fréquence de l'hétérotaxie rapportée dans le cadre des études épidémiologiques des maladies congénitales a été estimée à 1,44/10 000 naissances et représente tous les défauts cardiaques associés à des anomalies de l'axe gauche-droite. Encore là, des cas d'hétérotaxie sans défauts cardiaques ou encore des défauts silencieux n'ont pas été inclus dans cette étude (Casey, 1998).

## 3 LE DÉVELOPPEMENT DE L'AXE GAUCHE-DROITE CHEZ L'EMBRYON

Au cours du développement embryonnaire, même si l'axe gauche-droite est établi peu après l'axe dorso-ventral et antéro-postérieur, l'asymétrie se manifeste plutôt tard au niveau anatomique. La première manifestation grossière de la latéralité chez l'embryon de souris survient au jour embryonnaire 8,5 (6-8 somites). Notamment, le tube cardiaque, initialement droit, s'infléchit vers la droite. Quelques heures plus tard, l'asymétrie gauche-droite devient encore plus prononcée lorsque l'embryon commence à tourner selon son axe antéro-postérieur

dans la direction contraire à celle des aiguilles d'une montre. La rotation est accompagnée de la fermeture ventrale lorsque l'endoderme définitif de l'intestin ainsi que les extrémités latérales de l'embryon (ectoderme) croissent et fusionnent à la ligne médiane. Les mécanismes qui dirigent cet événement très complexe ne sont présentement pas connus. Toutefois, la prolifération asymétrique des tissus latéraux combinée aux contraintes physiques imposées par les membranes extraembryonnaires pourraient diriger certains de ces événements. (Harvey, 1998). D'ailleurs, il a déjà été rapporté que le mésoderme situé aux extrémités latérales de l'embryon prolifère davantage sur le côté gauche que sur le côté droit (Miller et Runner, 1978; Miller et White, 1998). Enfin, après la rotation de l'embryon, différents organes émergent et occupent leurs emplacements respectifs.

Le développement de l'axe gauche-droite chez les vertébrés peut être subdivisé en trois phases. La première étape consiste à différencier la gauche de la droite par rapport aux axes déjà existants, soit dorso-ventral et antéro-postérieur. Lors de la deuxième étape, l'asymétrie cellulaire localisée est propagée dans l'embryon. Les molécules déterminant l'asymétrie, concentrées d'un seul côté de la médiane, déclenchent alors des cascades menant à une expression asymétrique des gènes. La troisième étape consiste en la transmission de l'information asymétrique aux organes initialement symétriques et situés de façon médiane (tels que le coeur). L'interprétation des signaux asymétriques par les organes en formation se manifeste par prolifération et migration cellulaire différentielle.

### 3.1 La première étape: bris de la symétrie

#### 3.1.1 L'origine de l'axe gauche-droite

L'origine de la cascade contrôlant l'établissement de l'axe gauche-droite est inconnue. Les ciliés se voient transmettre l'asymétrie chirale par leurs parents (Nelsen *et al.*, 1989). Chez les escargots, on décèle les premiers signes de l'asymétrie lors des premières divisions cellulaires (van den Biggelaar, 1991). Le même phénomène est observé chez *Caenorhabditis elegans* où l'asymétrie est générée par les premières divisions cellulaires ainsi que par des pressions mécaniques exercées sur la coquille de l'oeuf (Wood, 1991; Wood, 1997; Hutter et Schnabel, 1994). Dans les organismes plus complexes tels que la grenouille et le poulet, les décisions concernant l'orientation de l'axe gauche-droite ne sont probablement prises qu'au stade de la blastula (Nascone et Mercola, 1997; Hyatt et Yost, 1998). Ceci est appuyé par l'observation que la manipulation des blastocystes chimériques de la souris n'affecte aucunement l'établissement de latéralité. Cependant, dans ce type d'expériences, il faut savoir différencier le point de flexibilité du point d'origine. La possibilité de la perturbation de l'axe par des manipulations expérimentales pendant une certaine fenêtre de développement n'indique pas quand la formation de l'axe est initiée, mais illustre plutôt la susceptibilité temporelle de l'axe aux stimuli exogènes.

On ne connaît pas encore avec certitude l'identité du tissu où la latéralité gauche-droite est initiée. Plusieurs gènes sont exprimés asymétriquement dans le noeud de Hensen et dans la ligne primitive de l'embryon de poulet (Levin *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 1997). Une étude récente suggère que le noeud n'est pas la source originale de l'information gauche-droite. Celle-ci lui est plutôt transmise par un tissu adjacent dont la nature exacte n'est pas connue et qui a été qualifié d'"organisateur gauche-droite" (Pagan-Westphal et Tabin, 1998; Hyatt et Yost, 1998). Toutefois, le noeud semble jouer un rôle important dans la propagation subséquente de la latéralité. Comme démontré chez la souris, les cellules

ventrales du noeud sont pourvues de cils mobiles qui génèrent un mouvement unidirectionnel du liquide extraembryonnaire. Il a été proposé que ce flot concentre des morphogènes de latéralité inconnus du côté gauche du noeud, ce qui déclenche probablement des signaux asymétriques (Nonaka *et al.*, 1998) (voir les sections 3.1.2 et 3.1.3).

### **3.1.2 L'orientation spatiale de l'axe gauche-droite**

Quelle que soit la provenance de cette information asymétrique, la base moléculaire de l'émergence des trois axes (dorso-ventral, antéro-postérieur et gauche-droite) reste encore à expliquer. Ce phénomène se produirait au niveau cellulaire et, tel que suggéré par certains, impliquerait le réseau du cytosquelette. Chez l'embryon de grenouille, lors de la première division cellulaire, des faisceaux temporaires de microtubules guident la rotation du cytoplasme par rapport au cortex et, par le fait même, définissent l'orientation de l'axe dorso-ventral (Yost, 1991). Chez l'embryon de souris, les cellules subissant la gastrulation semblent avoir une notion de l'axe dorso-ventral (glissement à partir de l'épiblaste vers l'endoderme primitif). Si l'on assume que l'axe antéro-postérieur précède l'axe gauche-droite, on peut spéculer que la ligne primitive, ou encore le noeud, calculent l'orientation de l'axe gauche-droite à partir de la polarité antéro-postérieure et dorso-ventrale (Levin et Mercola, 1998).

Brow et Wolpert (1990) ont proposé l'existence d'une molécule chirale, appelée molécule F, qui reconnaîtrait la polarité des deux axes déjà établis afin d'orienter le troisième axe. Selon un modèle, les microtubules alignés selon l'axe dorso-ventral et antéro-postérieur permettraient la liaison de la molécule F. La fixation de cette molécule orienterait le troisième axe et permettrait le transport unidirectionnel des molécules déterminant la latéralité par des protéines comme des dynéines (Brown et Wolpert, 1990; Brown *et al.*, 1991). Effectivement, chez la grenouille, l'ARN encodant Vg1, une protéine de la superfamille TGF $\beta$  régulant

l'établissement de l'axe gauche-droite, est distribué asymétriquement dans le cortex végétal de l'embryon grâce à l'association avec des microtubules (Hyatt et Yost, 1998; Elisha *et al.*, 1995).

Il existe un autre exemple de la conversion de la polarité antéro-postérieure en polarité gauche-droite. Les cils des cellules ventrales du noeud de la souris tournent dans le sens contraire aux aiguilles d'une montre. Grâce à la forme triangulaire du noeud au jour embryonnaire 7,75, le mouvement du liquide généré par les cils n'est pas circulaire, mais unidirectionnel (de la droite vers la gauche). Plus précisément, au sommet du triangle, il y a un flot faible du liquide vers la droite, tandis qu'à la base du triangle, il y a un flot fort vers la gauche. Le mouvement net du liquide est donc vers la gauche et, par conséquent, des signaux déterminant la latéralité sont probablement enclenchés uniquement du côté gauche du noeud (Nonaka *et al.*, 1998) (voir aussi la section 3.2).

### **3.1.3 Les dynéines et l'axe gauche-droite**

La perturbation des événements impliquant les microtubules est à la base de certains désordres de latéralité chez l'humain et la souris. Chez l'humain, le syndrome de Kartagener, caractérisé par le *situs inversus*, résulte des mutations dans le gène encodant les bras de dynéine axonemale (Afzelius, 1976; Afzelius, 1985). Chez la souris mutante *inversus viscerum (iv)*, atteinte d'hétérotaxie, des mutations dans le gène de la chaîne lourde de la dynéine (appelée 'left-right dynein', *lrd*) ont été identifiées (Supp *et al.*, 1997). Les dynéines axonemales fournissent la force motrice nécessaire pour le battement des cils et des flagelles (revue par Holzbaur et Vallee, 1994). L'expression de *lrd* a été détectée dans le noeud de la souris 7,75 jours *post coitum* (jpc) (Supp *et al.*, 1997). Cette dynéine pourrait donc jouer un rôle dans la mobilité des cils nodaux. De plus, l'invalidation génique des protéines motrices associées aux microtubules, *KIF3B* (Nonaka *et al.*, 1998) et *KIF3A* (Marszalek *et al.*, 1999), qui sont également exprimées dans le

noeud, mènent aux défauts de latéralité chez la souris. Le noeud des mutants KIF3B et KIF3A est complètement dépourvu de cils ce qui démontre que ces deux protéines sont requises pour la ciliogenèse nodale et, par conséquent, pour le fonctionnement normal du noeud en tant qu'un intermédiaire dans la voie de latéralité. Ainsi, les composantes du cytosquelette jouent indiscutablement un rôle dans l'établissement précoce de l'axe gauche-droite chez différentes espèces.

## 3.2 La deuxième étape: propagation de latéralité

### 3.2.1 L'expression asymétrique des gènes

Malgré le fait que le mécanisme d'initiation de polarité reste obscur, la compréhension des étapes subséquentes a sensiblement progressé au cours des dernières années. Plusieurs gènes exprimés de façon asymétrique chez différentes espèces de vertébrés ont été identifiés jusqu'à ce jour (revues par Beddington et Robertson, 1999; Ramsdell et Yost, 1998; Harvey, 1998) (Figure 1). Chez l'embryon de poulet, Levin *et al.* (1995, 1997) ont proposé une cascade de signalisation contrôlant la polarité gauche-droite. Cette cascade est initiée par l'*activine-βB*, exprimée du côté droit du noeud de Hensen au stade 3-5+. L'activine βB induit l'expression du *récepteur de l'activine du type IIA (cActRIIA)* et inhibe l'expression de *sonic hedgehog (shh)* du côté droit du noeud de Hensen. L'activité du shh persistante du côté gauche du noeud est mise en évidence par l'induction de l'expression de son récepteur *patched (ptc)*. La voie activine-shh souligne l'importance du noeud en tant que structure impliquée dans l'établissement de latéralité. Cependant, certaines évidences génétiques provenant de la souris mettent en doute le degré de conservation de cette cascade. Notamment, les souris mutantes *activine-βB<sup>-/-</sup>* (Matzuk *et al.*, 1995a) ou *ActRIIA<sup>-/-</sup>* (Matzuk *et al.*, 1995b) ne montrent aucun défaut de latéralité. Inversement, les souris *ActRIIB<sup>-/-</sup>* présentent un isomérisme thoracique droit (Oh et Li, 1997). Toutefois, le rôle de ActRIIB dans l'établissement de l'axe gauche-droite n'a pas encore été démontré

chez l'embryon de poulet (Levin *et al.*, 1995). De plus, bien que le développement gauche-droite semble affecté chez la souris *shh*<sup>-/-</sup> (C.C. Hui, communication personnelle), l'expression asymétrique de *shh* n'a pas été détectée chez l'embryon de souris (Collignon *et al.*, 1996). Ces divergences entre les espèces laissent croire que, ou bien cette cascade n'est pas conservée, ou bien des facteurs différents, mais apparentés à l'activine, participent à la transmission de l'information asymétrique par le noeud.

Le noeud de la souris montre également une expression asymétrique des gènes. Cette structure est composée de deux couches cellulaires: la couche ventrale, constituée de petites cellules cuboïdales monociliées et la couche dorsale, formée d'un épithélium cylindrique (Sulik *et al.*, 1994). Les cellules ventrales donnent naissance à la notochorde et à l'endoderme définitif, tandis que les cellules dorsales contribuent au plancher du tube neural (Beddington, 1994). *Nodal*, un membre de la superfamille TGF $\beta$ , est exprimé dans les cellules latérales de la couche ventrale. Initialement symétrique, l'expression de *nodal* devient progressivement plus intense du côté gauche du noeud, au stade de 3-4 somites (8,0 jpc) (Collignon *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1996). On ne sait pas encore si cette expression asymétrique autour du noeud est requise pour l'expression asymétrique des gènes dans la lame latérale gauche et le plancher du tube neural au jour embryonnaire 8,0 (voir ci-dessous). Récemment, un gène exprimé de façon complémentaire à *nodal* a été identifié. Il s'agit de *dte*, apparenté à la famille *cerberus/dan*, dont l'expression est plus intense du côté droit du noeud. Étant donné l'habileté de cette famille à bloquer la signalisation de BMP (bone morphogenic protein), appartenant à la superfamille TGF $\beta$ , on spécule que *dte* pourrait bloquer la signalisation de *nodal* à droite et augmenter ainsi le gradient effectif de *nodal* (Pearce *et al.*, 1999).

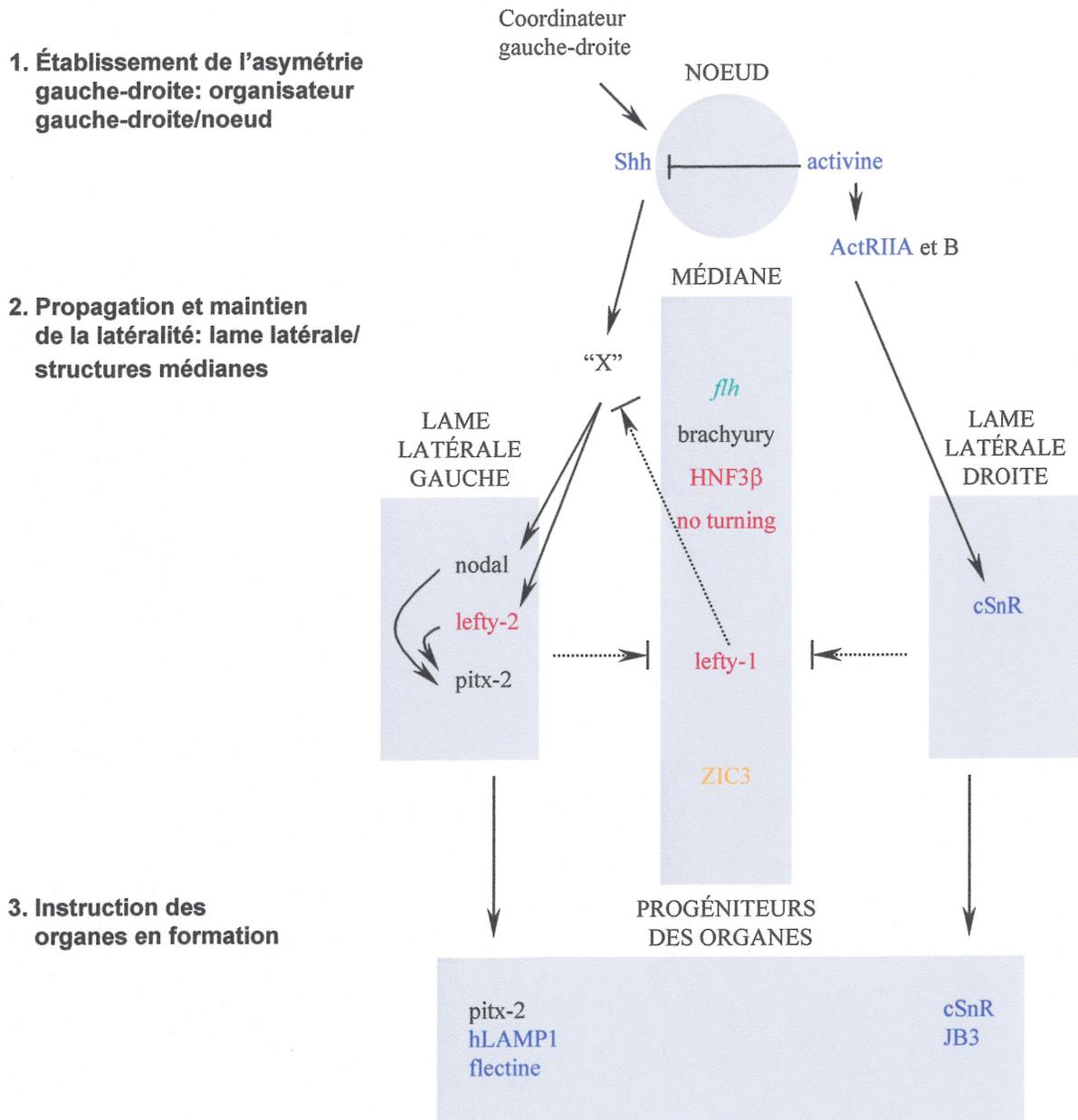
Chez l'embryon de poulet, l'expression asymétrique de *shh* autour du noeud est suivie de l'expression de *nodal* dans la lame latérale gauche. Toutefois, l'expression de *shh* est limitée à la région immédiatement adjacente au noeud, et,

étant donné la distance, il est peu probable que *shh* induise directement l'expression asymétrique des gènes dans la lame latérale. L'existence d'un facteur X, qui jouerait le rôle de relais, a donc été suggérée (Levin *et al.*, 1995; Dyson *et al.*, 1995). Chez la souris, ce facteur hypothétique, présent uniquement du côté gauche, induirait l'expression de *nodal* et *lefty-2* (un autre membre de la superfamille TGF $\beta$ ) dans la lame latérale gauche au jour embryonnaire 8,0 (3-4 somites). En effet, les transcrits de ces deux gènes apparaissent simultanément dans la région adjacente au noeud, pour s'étendre antérieurement jusqu'à la paroi dorsale de la cavité péricardique et, postérieurement, jusqu'à la limite du mésoderme émergeant de la ligne primitive. L'expression temporelle et spatiale identique (Collignon *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1996; Meno *et al.*, 1996; Meno *et al.*, 1997), ainsi que l'analyse des promoteurs de *lefty-2* et *nodal* (Saijoh *et al.*, 1999; Nonaka *et al.*, 1999) suggèrent que ces deux gènes se retrouvent sous le même contrôle transcriptionnel.

*Pitx-2* est un facteur de transcription à boîte homéo apparenté à *bicoid*, conservé à travers les espèces. Il est le seul effecteur connu de la cascade de latéralité et son expression est détectée dans la lame latérale gauche peu après l'apparition de *nodal* (Ryan *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998). L'expression de *pitx-2* persiste plus longtemps que celle de *nodal* et elle est détectée du côté gauche des organes en formation tels que le coeur et l'intestin. L'expression de *pitx-2* est induite ectopiquement par *shh*, *lefty* et *nodal* chez l'embryon de poulet et de la grenouille (Ryan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998). De plus, lorsqu'exprimé ectopiquement du côté droit de l'embryon, *pitx-2* induit l'isomérisme gauche du coeur et des dérivés de l'intestin (Logan *et al.*, 1998). Ainsi, *pitx-2* semble interpréter et exécuter le programme de développement établissant l'axe gauche-droite.

Certaines évidences expérimentales permettent d'inclure *snail*, un facteur de transcription à doigts de zinc, dans la liste des gènes impliqués dans l'établissement de la latéralité. L'homologue retrouvé chez le poulet, *cSnr-1*, est

exprimé dans la lame latérale droite. Les expériences semblent démontrer que *cSnr-1* agit en aval de nodal et que ce dernier supprime l'expression de *cSnr-1* dans la lame latérale gauche de l'embryon. En effet, l'expression ectopique de *cSnr-1* affecte le *situs* du coeur (Isaac *et al.*, 1997). Toutefois, on ne sait pas encore si *snail* influence la latéralité chez la souris, car les mutants *snail*<sup>-/-</sup> meurent avant l'apparition des premiers signes de l'asymétrie gauche-droite (Sefton *et al.*, 1998).



**Figure 1. La voie de signalisation gauche-droite.** (1) La latéralité est initiée dans le tissu adjacent au noeud qualifié d'organisateur gauche-droite. Par des mécanismes inconnus, l'information est transmise au noeud ce qui déclenche une expression asymétrique des gènes. (2) Ensuite, le noeud transmet le signal asymétrique à la lame latérale. L'expression asymétrique des gènes est maintenue d'un seul côté par les structures médianes telles que la notochorde et le plancher du tube neural (flèches pointillées avec barres). (3) L'information asymétrique est transmise par la lame latérale aux organes en formation. Les couleurs indiquent l'implication du gène dans la cascade de latéralité chez une espèce donnée: poulet (bleu), souris (rouge), poisson-zèbre (vert), humain (orange), plus d'une espèce (noir). Les flèches et les barres indiquent des inductions ou des répressions, plutôt que des interactions physiques. "X" est un facteur hypothétique. Adapté à partir de Ramsdell et Yost, TIG (1998).

### 3.2.2 Les structures médianes et la latéralité

Plusieurs expériences suggèrent que les structures médianes telles que le noeud, la notochorde et le plancher du tube neural jouent un rôle dans le bris de la symétrie et le maintien de l'asymétrie. La dégénérescence précoce de la notochorde chez le mutant de la souris *no turning* ou l'absence de la notochorde chez les mutants du poisson-zèbre *no tail (ntl)* et *floating head (flh)* causent une inflexion aléatoire du tube cardiaque (Melloy *et al.*, 1998; Danos et Yost, 1996). L'extirpation de la notochorde ou du tube neural chez les embryons de grenouille mène également à des défauts de latéralité (Lohr *et al.*, 1997). *HNF-3 $\beta$* , un facteur de transcription de type hélice-boucle-hélice exprimé dans la notochorde et le plancher du tube neural, est requis pour la formation du noeud et de la notochorde (Ang et Rossant, 1994). Les souris double hétérozygotes *HNF-3 $\beta$ <sup>+/-</sup>/nodal<sup>LacZ/+</sup>* montrent des défauts de positionnement des organes abdominaux et du coeur ainsi qu'une rotation aléatoire (Collignon *et al.*, 1996).

De plus, les études menées par Meno *et al.* (1998) suggèrent que les structures médianes agissent comme une barrière restreignant l'expression asymétrique des gènes au côté gauche de l'embryon. L'expression de *lefty-1*, un autre membre de la superfamille TGF $\beta$ , prédomine dans la partie gauche du plancher du tube neural 8,0 jpc (2-3 somites) (Meno *et al.*, 1996; Meno *et al.*, 1997). L'invalidation génique de *lefty-1* chez la souris résulte en un isomérisme thoracique gauche. De plus, on détecte une expression bilatérale de *lefty-2* et *nodal* chez les mutants *lefty-1<sup>-/-</sup>*. Ces deux observations suggèrent que *lefty-2* et *nodal* déterminent l'identité gauche de l'embryon tandis que *lefty-1* joue le rôle de barrière moléculaire qui restreint l'expression de ces deux gènes au côté gauche (Meno *et al.*, 1998).

L'existence de la barrière médiane chez l'embryon est donc largement acceptée. Cependant, la nature exacte de cette barrière et son mode de fonctionnement sont encore incertains. Deux modèles, pas nécessairement

exclusifs, ont été proposés. Dans le premier modèle, la ligne médiane et sa matrice extracellulaire pourraient constituer une barrière physique empêchant la diffusion des molécules signalisatrices du côté opposé de l'embryon (Ramsdell et Yost, 1998). Dans le deuxième modèle, la ligne médiane est une source active de molécules signalisatrices ayant un rôle inducteur ou répresseur (Lohr *et al.*, 1998; Levin et Mercola, 1998). L'analyse des souris *lefty-1*<sup>-/-</sup> suggère que *lefty-1*, exprimé dans le plancher du tube neural, antagoniserait l'action du facteur X, et l'empêcherait ainsi de traverser la ligne médiane. L'expression de *lefty-2* et *nodal* serait donc restreinte au côté gauche seulement. Effectivement, l'expression de *lefty-1* est détectée avant celle de *lefty-2* et *nodal* (Meno *et al.*, 1998). Cependant, cette hypothèse, aussi attrayante soit elle, implique l'existence d'un facteur encore inconnu.

Sans aucun doute, il existe d'autres facteurs produits par des structures médianes. Par exemple, Zic 3, un facteur de transcription à doigts de zinc exprimé dans la ligne primitive et dans le tube neural (Nagai *et al.*, 1997), est muté chez certains individus atteints d'hétérotaxie sporadique ou liée au chromosome X (Gebbia *et al.*, 1997). Son expression chez la souris est symétrique et, par conséquent, n'est pas très informative (Nagai *et al.*, 1997). L'identification des gènes cibles de Zic3 amènerait une meilleure compréhension du rôle des structures médianes dans le développement de l'axe gauche-droite.

### **3.2.3 La corrélation entre l'expression asymétrique des gènes et le situs**

Dans le cas de certains facteurs impliqués dans le développement de latéralité, il est possible d'établir une corrélation entre leur site d'expression et le *situs* viscéral. Par exemple, chez le mutant de la souris *inversion of embryonic turning* (*inv*), caractérisé par le *situs inversus*, l'expression de *nodal*, *lefty-2* et *pitx-2* est détectée uniquement dans la lame latérale droite (Meno *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1996; Collignon *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1998). Chez les souris *iv*

caractérisées par un *situs* aléatoire, l'expression de *nodal* et *pitx-2* adopte quatre patrons différents - gauche, droit, bilatéral ou absent (Lowe *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1998) - tandis que l'expression de *lefty-1* et *lefty-2* peut être gauche, droite ou bilatérale (Meno *et al.*, 1997). L'expression de *nodal* est également bilatérale chez les mutants *Fused toes (Ft)* et *no turning (nt)* caractérisés également par un *situs* aléatoire (Melloy *et al.*, 1998; Heymer *et al.*, 1997). Ces observations démontrent que les altérations du *situs* sont souvent précédées par des modifications prévisibles du patron d'expression de plusieurs gènes.

### 3.3 La troisième étape: instruction des organes en formation

L'information asymétrique doit être transmise aux organes en formation et ceux-ci doivent l'interpréter correctement. La plupart des gènes mentionnés ci-dessus sont exprimés de façon transitoire et disparaissent avant l'apparition des signes morphologiques de l'asymétrie. Uniquement l'expression de *pitx-2* persiste lors de l'organogénèse. L'expression, initiée dans la lame latérale, est également dans la partie gauche du coeur et de l'intestin. Les organes semblent donc interpréter à leur façon ce signal universel et l'adapter pour leurs propres besoins (Campionne *et al.*, 1999).

La transition de la symétrie à l'asymétrie résulte de la combinaison de plusieurs mécanismes qui causent une accumulation de cellules d'un côté seulement. Cette accumulation peut être due à une division, migration ou mort cellulaire différentielles. Par exemple, chez l'embryon de poulet, plus de progéniteurs provenant du côté droit contribuent au tube cardiaque et l'inflexion se fait également à droite (Stalsberg, 1969). Le changement de la forme des cellules lié aux modifications du cytosquelette peut aussi être à la base de l'inflexion cardiaque. Il a été démontré que des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine, telle que la cytochalasine B, bloquent ou inversent l'inflexion cardiaque (Itasaki *et al.*, 1991).

Certains gènes encodant des composantes de la matrice extracellulaire sont exprimés asymétriquement dans les champs cardiaques du poulet. Ceux-ci incluent la *lectine* (Tsuda *et al.*, 1996) et *hLAMP-1* (Smith *et al.*, 1997), exprimés à gauche, et *JB3* (Smith *et al.*, 1997), exprimée à droite. L'implication de la matrice extracellulaire dans l'établissement de l'axe gauche-droite a également été démontrée chez l'embryon de grenouille. Au stade de la gastrula, une matrice riche en fibronectine est déposée sur la membrane basale des cellules ectodermes qui servent de substrat à la migration des précurseurs de différents organes. Une perturbation localisée de la matrice par la microchirurgie mène à une asymétrie aléatoire localisée, tandis qu'une perturbation globale de la matrice par microinjection des polypeptides Arg-Gly-Asp ou de l'héparinase dans le blastocèle résulte en une asymétrie aléatoire globale. Ces expériences suggèrent que la matrice extracellulaire est impliquée dans la transmission l'information asymétrique aux progéniteurs de différents organes lors du développement (Yost, 1992).

On ne connaît pas encore le rôle que les molécules de la matrice extracellulaire jouent lors du développement de l'axe gauche-droite. Dans un contexte 'mécanique' de l'inflexion du coeur, elles ne constituent peut-être qu'un substrat passif pour des mouvements tissulaires. Alternativement, elles sont peut-être impliquées dans la signalisation cellulaire. Curieusement, à la fin de la gastrulation chez la grenouille, une inhibition de la synthèse des protéoglycans bloque l'inflexion cardiaque. Des protéoglycans sont des molécules de surface cellulaire et composantes de la matrice extracellulaire, impliquées dans une multitude d'interactions cellule-cellule et cellule-substrat. Entre autres, ils s'associent spécifiquement avec bFGF et TGF $\beta$ , et facilitent ainsi la liaison de ces facteurs à leur récepteurs de surface. Sachant l'importance des molécules de la matrice extracellulaire au cours du développement, on ne peut exclure la possibilité que l'interaction des protéoglycans avec des facteurs de croissance joue un rôle dans l'établissement de la latéralité (Yost, 1990).

#### 4 LA VITAMINE A ET SES DÉRIVÉS: INTRODUCTION

La vitamine A (rétinol) est un nutriment requis pour plusieurs processus physiologiques tels que la vision, la reproduction, la croissance, la défense immunitaire, la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire ainsi que le maintien de plusieurs tissus (revue par Blomhoff, 1994; De Luca, 1991). La déficience diététique expérimentale en vitamine A est à l'origine de plusieurs anomalies congénitales touchant principalement le coeur, les yeux ainsi que les systèmes circulatoire, uro-génital et respiratoire. Un excès diététique de la vitamine A cause l'hypervitaminose A caractérisée par la toxicité sur le système nerveux, le foie, les os et la peau.

Les dérivés synthétiques et naturels dont la fonction est similaire à celle de la vitamine A, sont appelés des rétinoïdes. Les rétinoïdes administrés lors de l'embryogenèse ont des effets tératogènes sur plusieurs structures, y incluant le coeur, les yeux, le crâne, le squelette, les membres, le système nerveux central et les structures craniofaciales (Teelmann, 1989). Toutes les espèces de vertébrés étudiées sont susceptibles aux effets tératogènes de la vitamine A (Geelen, 1979). Il existe plusieurs preuves que l'usage pharmacologique de certains rétinoïdes (isotrétinoïne, Accutane®) a un effet tératogène important sur l'humain. Ces observations sont plutôt préoccupantes car les rétinoïdes sont utilisés comme traitement des maladies de la peau ainsi que de différentes formes de cancer (Collins et Mao, 1999).

#### 5 LA SIGNALISATION PAR LES RÉTINOÏDES

Seulement certains rétinoïdes naturels possèdent une fonction biologique. Ceux-ci incluent l'acide *trans*-rétinoïque, l'acide *cis*-9-rétinoïque, le *cis*-11-rétinaldéhyde (Napoli, 1996), l'acide 3,4-didéhydrorétinoïque (Thaller et Eichele, 1990), et peut-être bien aussi l'acide 4-oxorétinoïque (Pijnappel *et al.*, 1993).

L'acide rétinoïque (AR) est considéré comme le dérivé le plus important de la vitamine A. Malgré leur structure simple, ces molécules exercent des effets multiples chez l'embryon et l'adulte. La diversité des réponses à l'AR découle directement de la complexité de la voie de signalisation des rétinoïdes. Tout d'abord, la concentration cellulaire de l'AR est étroitement contrôlée par une série d'enzymes de synthèse et de dégradation. Ensuite, deux familles de récepteurs nucléaires participent dans la transduction du signal de l'AR, soit les RAR et les RXR dont l'expression est modulée de façon spatio-temporelle. Sous forme d'hétérodimères RAR:RXR, ces récepteurs reconnaissent des éléments de réponse situés en *cis* des gènes cibles de l'AR. Le polymorphisme de ces éléments, tout comme les séquences avoisinantes, déterminent la nature des partenaires hétérodimériques ainsi que la force de la transactivation. De plus, les récepteurs nucléaires compétitionnent avec d'autres facteurs de transcription pour des molécules appelées des intégrateurs universels, phénomène qualifié de 'modulation croisée' (cross-talk). Finalement, les RAR et les RXR interagissent avec une série de coactivateurs et de corépresseurs transcriptionnels ce qui rajoute un autre niveau de complexité à la signalisation des rétinoïdes (revues par Chambon, 1996; Xu *et al.*, 1999; Freedman, 1999).

### **5.1 Le métabolisme de l'acide rétinoïque**

L'existence de plusieurs formes d'AR, dont la synthèse peut-être modulée de façon spécifique à chaque type cellulaire, constitue le premier niveau de complexité de la voie des rétinoïdes. La synthèse de l'AR comprend deux étapes: (1) la conversion de rétinol en rétinaldéhyde qui est une étape limitante et réversible, et (2) la conversion de rétinaldéhyde en AR qui est une étape irréversible. Les membres de la famille d'alcool désydrégénases (adh) et de désydrégénases/réductases à courte chaîne (sdr) catalysent la première réaction tandis que la seconde est catalysée par la famille des aldéhyde désydrégénases (ALDH) (Duester, 1996).

La rétinaldéhyde déshydrogénase de type 2 (*raldh-2*) est considérée comme l'enzyme principale impliquée dans l'oxydation du rétinaldéhyde en AR chez l'embryon. Le patron d'expression de cette enzyme coïncide avec la distribution de l'AR au cours de l'embryogenèse (Niederreither *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1996). L'inactivation génique de *raldh-2* chez la souris a des effets drastiques sur le développement embryonnaire (Niederreither *et al.*, 1999). Des embryons mutants se caractérisent par une dilatation du coeur, les régions postérieure et frontonasale tronquées, des bourgeons de membres hypoplastiques, un tube neural ouvert ainsi que l'absence de la rotation embryonnaire et de l'inflexion du tube cardiaque. Probablement dû à des défauts cardiaques, les mutants meurent avant le jour embryonnaire 10,5. Le phénotype est donc plus précoce et plus sévère que celui observé chez les souris déficientes en vitamine A (DVA) ou les mutants *RAR* (voir les sections 6.1 et 6.3). La plupart des malformations observées dont l'élongation du tronc, la rotation embryonnaire, ainsi que l'inflexion et le développement cardiaques peuvent être prévenues par l'administration maternelle d'AR ce qui démontre que c'est bien la déficience extrême en AR qui cause le phénotype. Somme toute, cette expérience apporte des preuves solides supportant l'importance de l'AR au cours de l'embryogenèse.

P450RAI, un membre d'une nouvelle classe de cytochromes appelés CYP26, participe à la dégradation de l'AR en dérivés plus polaires soit l'acide 4-hydroxyrétinoïque, l'acide 4-oxorétinoïque et l'acide 18-hydroxyrétinoïque. P450RAI est une cible directe de l'AR. Sa réponse au traitement étant très rapide, P450RAI participe vraisemblablement à la boucle autorégulatrice contrôlant le niveau d'AR dans la cellule (Abu-Abed *et al.*, 1998). L'expression de cette enzyme au cours du développement embryonnaire est très dynamique. En fait, elle montre une complémentarité flagrante avec celle de *raldh-2* (Fujii *et al.*, 1997; Iulianella *et al.*, 1999).

## 5.2 Les récepteurs de l'acide rétinoïque

### 5.2.1 Les RAR et les RXR

Un autre niveau de complexité découle de l'existence de deux familles de récepteurs de l'AR, les RAR, activés par les ligands endogènes l'acide *trans*-rétinoïque et l'acide *cis*-9-rétinoïque, et les RXR, activés par l'acide *cis*-9-rétinoïque seulement. Les RAR comprennent trois sous-types encodés par différents gènes, soit *RAR $\alpha$* , *RAR $\beta$*  et *RAR $\gamma$* . Chaque sous-type comprend plusieurs isoformes qui diffèrent par leur extrémité N-terminale, soit *RAR $\alpha$ 1* et 2, *RAR $\beta$ 1-4*, ainsi que *RAR $\gamma$ 1* et 2, toutes générées par l'épissage alternatif et l'usage différentiel des promoteurs. Les RXR se divisent également en trois sous-types, soit *RXR $\alpha$* , *RXR $\beta$*  et *RXR $\gamma$*  comprenant chacun deux isoformes. Les RAR et les RXR possèdent des patrons d'expression spécifiques à certains tissus embryonnaires, exceptés *RAR $\alpha$*  et *RXR $\beta$*  qui montrent un patron d'expression plus ubiquiste que les autres sous-types (Dollé *et al.*, 1990; Ruberte *et al.*, 1991; Dollé *et al.*, 1994). Ainsi, certains tissus semblent caractérisés par une combinaison donnée de RAR et de RXR.

Sous forme d'hétérodimères RAR:RXR, les récepteurs interagissent spécifiquement avec des éléments de réponse appelés les RARE, situés en *cis* des gènes cibles. Ces éléments sont généralement constitués de deux répétitions directes de la séquence consensus PuG(G/T)TCA séparées par une à cinq bases (DR-1 à DR-5). Dans le cas de DR2 et DR5, le RXR occupe le demi-site en 5' tandis que le partenaire RAR occupe celui en 3' (Kurokawa *et al.*, 1993; Zechel *et al.*, 1994b). À part l'espacement, des différences subtiles dans la séquence des hexamères et dans la région avoisinante en 5', modulent l'affinité du récepteur pour son élément de réponse (Mader *et al.*, 1993; Vivanco *et al.*, 1991). Théoriquement, le polymorphisme des RARE, ainsi que le nombre de combinaisons hétérodimériques RAR:RXR potentielles, pourraient être

responsables de l'activation spécifique d'un ensemble donné de gènes, propre à un tissu donné (Chambon, 1996).

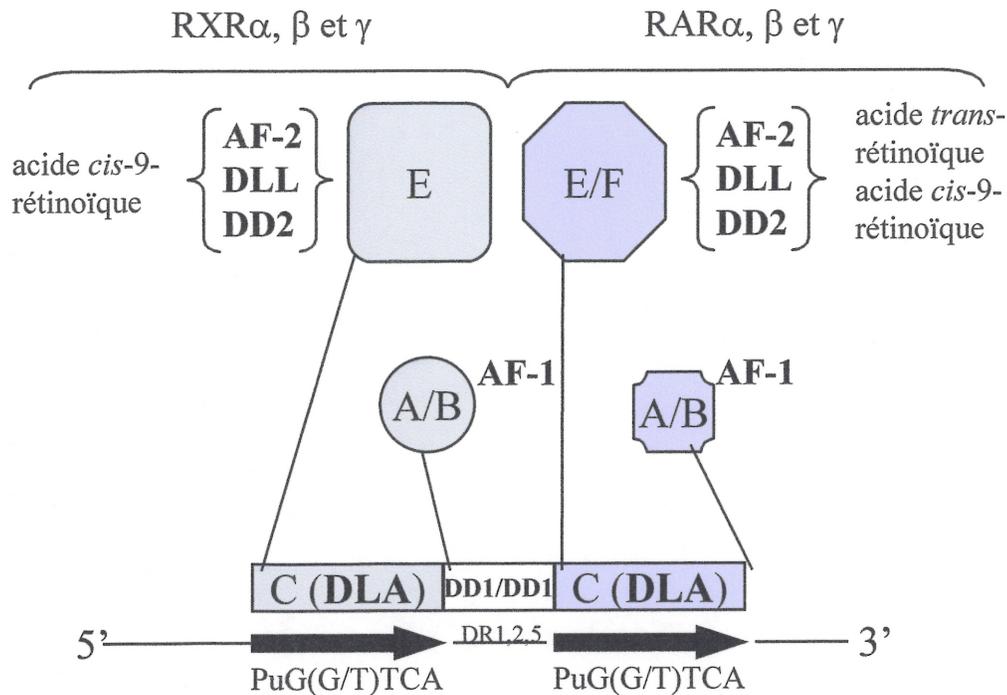
Les RXR hétérodimérisent également avec d'autres récepteurs nucléaires, notamment le récepteur de l'hormone thyroïdienne (RHT), le récepteur de la vitamine D, FXR (farnesoid X receptor), des récepteurs orphelins PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), LXR, NGFI- $\beta$  ainsi que plusieurs autres (revue par Mangelsdorf et Evans, 1995; Leblanc et Stunnenberg, 1995). Bien que le RXR est considéré comme étant un partenaire silencieux dans la plupart des cas (Kurokawa *et al.*, 1994; Forman *et al.*, 1995), certaines expériences *in vitro* montrent qu'il peut lier son ligand et travailler en synergie avec son partenaire hétérodimérique (revue par Leblanc et Stunnenberg, 1995). *In vitro*, les RXR forment également des homodimères. Toutefois, comme l'acide *cis*-9-rétinoïque n'est pas détecté chez l'embryon de souris (Horton et Maden, 1995) et l'homodimérisation n'a pas encore été clairement démontrée *in vivo*, l'importance des RXR:RXR au cours du développement est encore très controversée.

### **5.2.2 La structure des récepteurs de l'acide rétinoïque**

Les RAR et les RXR présentent plusieurs ressemblances au niveau de leur structure primaire, habituellement divisée en régions A à F (revue par Chambon, 1996) (Figure 2). Les régions amino-terminales A/B incluent le domaine de transactivation AF-1 qui est indépendant du ligand. La séquence de ces deux régions varie entre différents sous-types et isoformes. La région C contient un domaine de liaison à l'ADN (DLA) contenant deux doigts de zinc qui sont hautement conservés entre les trois sous-types des RAR (94-97%) et des RXR (91-97%).

Le reste de la structure d'un récepteur nucléaire consiste en une région D contenant un signal de translocation nucléaire et un domaine d'interaction avec

des corépresseurs ainsi qu'une région E contenant un domaine de liaison au ligand (DLL), un domaine de dimérisation et un domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand (AF-2). La région E est également hautement conservée entre différents RAR (84-90%) et RXR (88-95%). Il a été démontré que les domaines D et E interagissent avec de nombreux corépresseurs et coactivateurs de la transcription (voir la section 5.2.4). La fonction de la région F, retrouvée uniquement dans les RAR, est présentement inconnue.



### Figure 2. Les récepteurs de l'acide rétinoïque: structure et fonction.

La représentation schématique de l'hétérodimère RAR:RXR liant son élément de réponse (RARE), constitué de deux répétitions directes de l'hexamère PuG(G/T)TCA, séparées par une, deux ou cinq bases (DR). Le RXR lie uniquement l'acide *cis*-9-rétinoïque, tandis que le RAR lie l'acide *cis*-9-rétinoïque et l'acide *trans*-rétinoïque. Le récepteur, divisé en régions A à F, comprend un domaine de liaison à l'ADN (région C: DLA) et un domaine de liaison au ligand (région E: DLL). Une surface de dimérisation (DD2), ainsi qu'un domaine d'activation AF-2 dépendant du ligand, sont également inclus dans la région E. Un domaine d'activation AF-1 indépendant du ligand est présent dans la région A/B. Une surface de dimérisation indépendante (DD1), formée par les DLA, détermine la nature des partenaires hétérodimériques liés aux éléments DR. Sur les éléments DR-2 et DR-5, la polarité de liaison des hétérodimères est telle que le RXR lie l'hexamère en 5', tandis que le RAR lie celui en 3'. Dans le cas de DR-1, cette polarité peut être inversée. Voir le texte pour les détails. Adapté à partir de Chambon, FASEB J. (1996).

### **5.2.3 La liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque au ligand et à l'ADN**

Des expériences biochimiques et cristallographiques indiquent que la liaison sélective des dimères RXR:RXR aux éléments DR1, des RAR:RXR aux éléments DR2 et DR5 et des RHT:RXR aux éléments DR4 est dictée par des interactions coopératives et des encombrements stériques entre les DLA des partenaires de dimérisation. Deux surfaces de dimérisation asymétriques se forment dans le DLA des RAR et des RXR et une seule dans le DLA du TR (Zechel *et al.*, 1994b; Zechel *et al.*, 1994a). Les interactions entre les surfaces de dimérisation des deux récepteurs permettent le rapprochement des DLA et donc la liaison spécifique à l'ADN. Le choix de l'espacement entre deux demi-sites est donc déterminé par la taille des DLA dimérisés. Évidemment, la dimérisation des DLA peut survenir uniquement sur les éléments de type DR. Dans le cas des éléments de type palindromique, la liaison coopérative des hétérodimères est moins efficace et dépend entièrement des surfaces de dimérisation présentes dans le DLL (Chambon, 1996).

Plusieurs études *in vitro* démontrent que la liaison des RAR:RXR à l'ADN est indépendante du ligand. Notamment, il a été rapporté que le ligand n'est requis ni pour la formation des hétérodimères RAR:RXR en solution (Leid *et al.*, 1992), ni pour la liaison des hétérodimères RAR:RXR aux éléments de réponse *in vitro*, dans les levures et dans les cellules Cos-1 transfectées (Nagpal *et al.*, 1993; Heery *et al.*, 1997). De plus, il a été démontré que la variante oncogénique de RHT $\alpha$  (v-erbA) se lie *in vivo* à un élément de réponse dans le promoteur de l'anhydrase carbonique II. Puisque les mutations dans v-erbA empêchent la liaison du ligand, il est clair que la liaison à l'ADN ne dépend pas du ligand dans le cas de ce récepteur nucléaire (Ciana *et al.*, 1998).

#### 5.2.4 L'activation de la transcription par des récepteurs de l'acide rétinoïque

En absence du ligand, l'hétérodimère RAR:RXR se lie à la chromatine à la surface d'un nucléosome et facilite la formation de la structure répressive de la chromatine en recrutant des corépresseurs (revues par Perlmann et Evans, 1997; Xu *et al.*, 1999). Ceux-ci incluent NCoR (nuclear receptor corepressor) (Kurokawa *et al.*, 1995) et son homologue SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptors) (Chen et Evans, 1995). Les deux interagissent avec les RAR en absence du ligand et cette interaction requiert la région D du récepteur, située entre le DLA et le DLL. Des mutations dans la région D empêchent l'interaction des RAR avec NCoR et, par conséquent, abolissent la répression de la transcription. Les corépresseurs NCoR et SMRT attirent un complexe contenant Sin3 (homologue du répresseur transcriptionnel de la levure Sin3p), des désacétylases des histones (HDAC1 et 2), ainsi que plusieurs autres protéines dont le rôle est encore obscur (Horlein *et al.*, 1995; Chen et Evans, 1995). Ce complexe, lorsque recruté à proximité de l'ADN, crée un domaine désacétylé couvrant un à deux nucléosomes (Kadosh et Struhl, 1998; Rundlett *et al.*, 1998). La désacétylation des histones favorise la structure compacte des nucléosomes, ce qui cause une répression de la transcription *in vivo*. Ainsi, l'interaction des récepteurs nucléaires avec des corépresseurs n'inhibe pas directement la transcription, mais crée plutôt un domaine localisé de répression qui, indirectement, diminue la transcription par l'ARN polymérase II.

La liaison du ligand cause un changement conformationnel de l'hétérodimère RAR:RXR, la dissociation des corépresseurs et la liaison des coactivateurs. Ces derniers incluent une nombreuse famille de protéines appelées coactivateurs p160 qui ont été identifiés grâce à leur liaison au domaine de transactivation AF-2. Entre autres, trois protéines homologues en font partie: SRC-1/NCoA-1 (steroid receptor coactivator 1/nuclear receptor coactivator 1) (Onate *et al.*, 1995), TIF2/Grip-1/NCoA-2 (transcriptional intermediary factor 2/glucocorticoid receptor interacting protein 1/nuclear receptor coactivator 2) (Hong *et al.*, 1997;

Voegel *et al.*, 1998) et pCIP/ACTR/AIB1 (p/300/CBP co-integrator associate protein/activator of the thyroid and retinoic acid receptors/amplified in breast cancer 1) (Torchia *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997). La surexpression de ces protéines stimule l'activité transcriptionnelle d'un grand nombre de facteurs de transcription et ce, de façon dépendante du ligand (Torchia *et al.*, 1997). Étant donné l'habilité d'interaction des facteurs p160 avec CBP/p300 et p/CAF, on croit que le rôle primaire de ceux-là est de recruter des coactivateurs munis d'une activité transacétylase à proximité des facteurs de transcription tels que récepteurs nucléaires (voir ci-dessous). SRC-1/NCoA-1 et pCIP/ACTR/AIB1 possèdent également une faible activité transacétylase, ce qui suggère qu'ils puissent participer au remodelage de la chromatine (Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997). L'analyse structure-fonction des activateurs p160 a révélé la présence de plusieurs copies du motif LXXLLL (où X désigne un acide aminé quelconque) qui est requis pour l'interaction avec les récepteurs nucléaires (Heery *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997). Toutefois, il n'est pas connu encore si ces motifs influencent la spécificité d'interaction entre le coactivateur et le récepteur nucléaire. Pour le moment, on soupçonne l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les membres de la famille p160, car l'inactivation génique de *SRC-1/NCoA-1* chez la souris mène à un phénotype relativement mineur avec une augmentation simultanée des niveaux de TIF2/Grip1/NCoA-2 (Xu *et al.*, 1998).

CBP/p300 est un intégrateur transcriptionnel impliqué dans la signalisation via plusieurs facteurs de transcription, y incluant c-jun, c-myb, MyoD, E2F2, etc., ainsi que la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdiennes (Goldman *et al.*, 1997). L'interaction de CBP/p300 avec des récepteurs RAR implique le domaine de transactivation AF-2 et dépend de la liaison du ligand (Chakravarti *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 1996). De plus, par son domaine C-terminal, CBP/p300 interagit avec SRC-1/NCoA-1 et TIF2/Grip1/NCoA-2 et, par cette liaison, active la transcription de façon synergique (Voegel *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1996a). Plusieurs résultats supportent le rôle de CBP/p300 dans l'activation transcriptionnelle impliquant des RAR. Notamment, *in vitro*, des anticorps contre

CBP inhibent efficacement l'expression des gènes cibles d'AR normalement induite en présence du ligand (Kamei *et al.*, 1996; Chakravarti *et al.*, 1996). *In vivo*, la transcription des gènes régulés par l'AR est considérablement affectée dans des fibroblastes dérivés de la souris *p300<sup>-/-</sup>* (Yao *et al.*, 1998b). Les protéines CBP et p300 possèdent également une activité transacétylase (Bannister et Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1998). Le remodelage de la chromatine par CBP/p300 recrutée par les récepteurs nucléaires pourrait donc promouvoir l'initiation de la transcription.

Récemment, l'utilisation des ribozymes de type hammerhead clivant spécifiquement l'ARNm de CBP ou de p300 a permis de démontrer que, malgré leur homologie, celles-ci jouent des rôles distincts dans les cellules du carcinome embryonnaire murin F9 (Kawasaki *et al.*, 1998). Tandis que les deux protéines participent dans l'apoptose des cellules F9 induite par l'AR, uniquement p300 semble requis pour la différenciation induite par l'AR. De plus, l'induction de l'expression du gène cible de l'AR, p21, est affectée seulement lorsque p300 est absent. Inversement, l'induction de p27 dépend plutôt du niveau de CBP. Cette étude est la première qui démontre l'existence des différences physiologiques entre CBP et p300 *in vivo*.

Finalement, au complexe contenant l'hétérodimère RAR:RXR, des coactivateurs p160 et CBP/p300 s'ajoute p/CAF (CBP/p300 associated factor), l'homologue mammifère de GCN5, une acétyl transférase prototype provenant de la levure. p/CAF interagit avec CBP et quelques-uns des coactivateurs p160 par l'intermédiaire de son extrémité N-terminale et avec des RAR, par son domaine C-terminal (Blanco *et al.*, 1998; Korzus *et al.*, 1998). Ce coactivateur fait partie d'un complexe contenant environ une vingtaine de protéines, soit des TAF et des protéines apparentées à TAF (Ogryzko *et al.*, 1998). Ces partenaires créent un pont entre p/CAF et la machinerie transcriptionnelle de base d'une part et augmentent l'activité transacétylase de p/CAF d'autre part. On pourrait donc imaginer un scénario où la liaison du ligand au RAR promouvoit le recrutement

séquentiel des coactivateurs p160, CBP/p300 et p/CAF qui remodelent la chromatine et favorisent l'assemblage de l'appareil transcriptionnel de base et l'initiation de la transcription.

Le rôle exact des coactivateurs dans l'initiation de la transcription est encore mal compris. Le mécanisme d'activation transcriptionnelle dépendant du ligand a été étudié dans le cas du récepteur des oestrogènes (RE) et p300 en utilisant un système reproduisant la chromatine *in vitro* (Kraus et Kadonaga, 1998). En absence du RE, p300 n'avait que très peu d'effet sur la transcription, tandis qu'une synergie marquée était observée en présence du RE lié à son ligand. Toutefois, cette coopération était requise seulement pour une initiation efficace de la transcription, mais pas pour la réinitiation. Ces résultats suggèrent que le RE et p300 facilitent l'assemblage du complexe de préinitiation sur le promoteur possiblement via la modification de la structure de l'ADN. Ensuite, la réinitiation est prise en charge par le récepteur qui reste lié à certains facteurs de transcription de base pendant plusieurs cycles de transcription.

Les RAR contiennent deux domaines d'activation distincts qui travaillent en synergie, soit AF-1 qui est constitutif, et AF-2 qui est dépendant du ligand (Chambon, 1996). Comme discuté ci-dessus, l'association du domaine d'activation AF-2 avec des coactivateurs promouvoit l'activation de la transcription, vraisemblablement à travers un mécanisme impliquant la remodelisation de la chromatine (Xu *et al.*, 1999). Toutefois, le mécanisme par lequel le domaine AF-1 active la transcription est encore peu connu. Une étude a démontré que la transactivation par AF-1 du RAR $\alpha$ 1 est stimulée par la phosphorylation du résidu sérine 77 par le complexe ternaire CAK contenant cdk7, la cycline H et le facteur d'assemblage MAT1. De plus, la phosphorylation de AF-1 est augmentée par l'association de CAK à TFIIH. Une interaction directe entre le complexe CAK et le facteur TFIIH a également été détectée *in vitro* et des complexes RAR $\alpha$ -TFIIH ont été isolés à partir des extraits nucléaires (Rochette-Egly *et al.*, 1997). Ainsi, la transactivation par AF-1 semble dépendre de la phosphorylation par un facteur de

transcription de base. Cependant, plusieurs questions persistent, car, par exemple, on ne comprend pas encore comment l'interaction entre AF-1 et TFIIH augmente la transcription.

### **5.2.5 La 'modulation croisée'**

La découverte de la 'modulation croisée' (cross-talk) a rajouté un autre niveau de complexité à la voie de signalisation des rétinoïdes. Nicholson *et al.* (1990) et Lafyatis *et al.* (1990) étaient les premiers à rapporter l'antagonisme réciproque entre les RAR et l'AP-1. Plus précisément, ils ont démontré que les sites AP-1 présents dans les promoteurs de la stromélysine et de la collagénase médiaient la répression de la transcription en présence de l'AR. Cette répression était également observée lorsqu'un des trois sous-types des RAR était surexprimé dans la cellule. Comme aucune interaction entre les sites AP-1, ou les composantes du complexe AP-1, et les RAR n'a encore été détectée, le mécanisme moléculaire responsable de cette 'modulation croisée' reste spéculatif. Toutefois, il a été proposé que l'inhibition de la fonction des récepteurs nucléaires par le complexe AP-1 (et vice-versa) découle, du moins en partie, de la compétition entre les deux complexes d'activation pour l'intégrateur transcriptionnel, CBP/p300. En effet, une augmentation des niveaux intracellulaires de CBP abolit les effets répresseurs du complexe AP-1 sur la fonction transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Kamei *et al.*, 1996).

L'importance physiologique de la 'modulation croisée' a été démontrée dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes. Notamment, des souris mutantes portant une mutation dans le domaine de dimérisation du récepteur ont été créées (GR<sup>dim/dim</sup>). Cette mutation empêche la transactivation dépendante de la liaison à l'élément de réponse GRE, mais n'affecte pas la transrépression de l'activité des autres facteurs de transcription comme AP-1 (Reichardt *et al.*, 1998). Les deux fonctions du récepteur, dépendante et indépendante de la liaison à l'ADN,

semblent donc facilement dissociables. Donc, dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes, la 'modulation croisée' est un phénomène bien réel, important au niveau physiologique. Se basant sur ces résultats et sur les ressemblances entre les récepteurs nucléaires, on pourrait donc anticiper un mécanisme similaire dans le cas des RAR.

Somme toute, le phénomène de la 'modulation croisée' crée un système de signalisation sophistiqué où les récepteurs nucléaires, en plus de répondre directement à l'action de l'hormone, interagissent avec la voie de signalisation déclenchée par des hormones/facteurs de croissance signalant à travers les récepteurs membranaires et la voie Raf/Ras/MAPK.

## **6 LE RÔLE DES RÉTINOÏDES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT**

Plusieurs approches ont été élaborées afin d'étudier le rôle des rétinoïdes lors du développement pré- et postnatal. Les toutes premières incluent la création des modèles animaux déficients en vitamine A (DVA) et l'administration d'un excès d'AR à différentes espèces de vertébrés. Les plus récentes impliquent l'élaboration des deux systèmes distincts: l'invalidation génique des RAR dans (1) les cellules F9 afin d'étudier le rôle des RAR lors de la différenciation *in vitro* et, (2) chez la souris, afin d'étudier le rôle des RAR au cours du développement embryonnaire.

### **6.1 L'insuffisance et l'excès d'acide rétinoïque**

Les premières études visant à comprendre la fonction de la vitamine A employaient des animaux DVA ou des animaux traités avec des doses pharmacologiques d'AR (revue par Means et Gudas, 1995). Des études de déficience ont montré que la vitamine A est indispensable pour la survie, la croissance, la reproduction, la vision ainsi que pour le maintien de nombreux

tissus. Plus précisément, le syndrome de déficience postnatal est caractérisé par une métaplasie squameuse de plusieurs épithélia, une dégénérescence des tubes séminifères et des photorécepteurs. À l'exception de cette dernière, toutes les autres malformations peuvent être prévenues par l'administration de l'AR (Chambon, 1994). Les souris exposées à la déficience au cours de l'embryogenèse présentent plusieurs malformations congénitales. Des défauts du système respiratoire, uro-génital et cardio-vasculaire ainsi que des malformations oculaires constituent les anomalies les plus importantes (Wilson *et al.*, 1953).

Des doses pharmacologiques d'AR ont été utilisées afin d'identifier des structures sensibles à l'AR, donc celles qui pourraient éventuellement en être la cible physiologique. L'effet d'un excès d'AR dépend de la concentration à laquelle l'embryon est exposé et du stade embryonnaire où le traitement est effectué. Des doses faibles (10mg/kg du poids maternel) induisent des malformations mineures telles que des transformations homéotiques tandis que de hautes doses (100mg/kg) affectent presque tous les systèmes en développement. La gastrulation et l'organogenèse constituent des périodes de sensibilité accrue au traitement avec l'AR (Collins et Mao, 1999). Plus de 40 différentes malformations, spécifiques à une fenêtre donnée, peuvent être induites chez l'embryon de hamster par des traitements séparés par des périodes aussi courtes que six heures (Shenefelt, 1972). Ainsi, selon le stade embryonnaire, l'AR cible des populations cellulaires spécifiques. Entre autres, l'excès d'AR perturbe les cellules de la crête neurale, ce qui induit des malformations craniofaciales, thymiques et cardiovasculaires (Collins et Mao, 1999).

Le mécanisme tératogène qui est à la base de cette embryopathie est encore peu connu. L'effet d'une dose excessive d'AR peut être indépendant ou dépendant des récepteurs nucléaires. Le mécanisme d'action indépendant des récepteurs consiste par exemple en une modification de l'état de phosphorylation cellulaire, ce qui peut mener à la nécrose (Kitabayashi *et al.*, 1994). Lorsque la tératogénie implique des récepteurs nucléaires, le niveau de transcription de

plusieurs gènes cibles de l'AR peut être altéré ce qui mène à un développement anormal. Le nombre de gènes dont l'expression est modulée par le traitement avec l'AR dépasse 200 et il croît sans cesse (Gudas, 1994; Clagett-Dame et Plum, 1997). Les processus suivants peuvent être affectés via l'activation des récepteurs nucléaires: apoptose (Alles et Sulik, 1990), morphogenèse (Kessel et Gruss, 1991), différenciation (Agarwal et Sato, 1993), migration (Lee *et al.*, 1995), prolifération (Nagpal *et al.*, 1997) et inflammation (Leber et Denburg, 1997; Takada *et al.*, 1997). Des expériences d'inactivation génique chez la souris amènent la preuve que l'induction de certaines malformations requiert la présence d'un récepteur RAR donné. Plus précisément, le traitement des souris de type sauvage avec un excès d'AR au stade embryonnaire 8,5 induit, entre autres, le spina-bifida, la troncation du squelette axial postérieur et la fusion ou la dégénérescence des côtes. Par contre, le mutant  $RAR\gamma^{-/-}$  est totalement résistant au traitement, ce qui suggère que l'effet tératogène de l'AR sur le squelette implique le récepteur  $RAR\gamma$  (Lohnes *et al.*, 1993).

Souvent, les mêmes anomalies congénitales sont observées dans une situation de déficience ou d'excès d'AR. On propose deux explications à ce phénomène. La manipulation de la concentration de l'AR peut, ou bien affecter les mécanismes qui se retrouvent à la base du même processus, ou bien perturber deux événements distincts qui mènent à des malformations convergentes. Par exemple, dans le cas d'excès et d'insuffisance, on observe des malformations des dérivés des arcs aortiques. Toutefois, la sensibilité temporelle des arcs aortiques à la déficience et à l'excès est différente, ce qui suggère que les effets de deux traitements procèdent à travers deux voies distinctes (Wilson *et al.*, 1953; Shenefelt, 1972).

## 6.2 La différenciation des cellules F9 *in vitro*

Les rétinoïdes sont des régulateurs très puissants de la différenciation cellulaire *in vitro*. Par exemple, le traitement des cellules de carcinome embryonnaire F9 de la souris avec différentes doses d'AR entraîne une induction contrôlée de l'endoderme primitif, pariétal ou viscéral. Afin d'identifier des récepteurs spécifiques impliqués dans ces trois voies de différenciation, les cellules F9 dépourvues de RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$  ou RXR $\alpha$  ont été générées (Taneja *et al.*, 1995; Chiba *et al.*, 1997). Plusieurs conclusions importantes ont été tirées à partir de cette étude. Malgré les similarités fonctionnelles des RAR, observées *in vitro* et dans les cellules transfectées, RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  affectent la différenciation des cellules F9 de façon distincte. D'une part, suivant le traitement avec l'AR, les cellules F9 RAR $\alpha^{-/-}$  ne forment plus l'endoderme pariétal et la différenciation en endoderme viscéral est retardée. D'autre part, les cellules F9 requièrent le RAR $\gamma$  pour la formation de l'endoderme primitif et pariétal, mais pas l'endoderme viscéral. Finalement, le RXR $\alpha$  affecte les trois voies de différenciation. Ces expériences suggèrent que le RAR $\alpha$  et le RAR $\gamma$  hétérodimérisent avec le RXR, conclusion supportée également par l'invalidation génique de ces récepteurs chez la souris (voir la section 6.3). De plus, la réinsertion des RAR dans les cellules RAR $^{-/-}$  a permis d'attribuer des rôles spécifiques aux domaines distincts des récepteurs. Par exemple, le site de phosphorylation par la protéine kinase A du RAR $\alpha$  est impliqué dans la différenciation de l'endoderme pariétal, contrairement au site correspondant du RAR $\gamma$ . Ainsi, différentes isoformes intègrent et interprètent différents signaux et stimuli cellulaires.

### 6.3 L'invalidation génique des RAR et des RXR chez la souris

L'approche de l'invalidation génique des récepteurs RAR et RXR chez la souris a été privilégiée par plusieurs laboratoires étudiant le rôle des récepteurs nucléaires *in vivo*.

Les souris déficientes en  $RAR\alpha 1$ ,  $RAR\beta 1$ ,  $RAR\beta 3$  et  $RAR\gamma 2$  semblent normales (Li *et al.*, 1993; Ghyselinck *et al.*, 1998; Lohnes *et al.*, 1993). Par contre, l'élimination de toutes les isoformes  $RAR\alpha$  ou  $RAR\gamma$  mène aux phénotypes observés chez les souris DVA, soit mortalité élevée, croissance ralentie et stérilité chez le mâle. Les mutants  $RAR\beta 2^{-/-}$  et  $RAR\beta^{-/-}$  montrent des anomalies oculaires caractéristiques des souris DVA (Ghyselinck *et al.*, 1997). Des malformations congénitales relativement mineures sont également observées chez les mutants  $RAR\alpha^{-/-}$ ,  $RAR\beta^{-/-}$ ,  $RAR\gamma^{-/-}$  et  $RAR\gamma 1^{-/-}$  ce qui contraste avec l'étendue de l'expression de ces récepteurs dans les tissus embryonnaires (Lufkin *et al.*, 1993; Lohnes *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1995; Subbarayan *et al.*, 1997).

Afin de tester la possibilité de redondance fonctionnelle entre différents récepteurs RAR, des double mutants ont été créés. Ceux-là se caractérisent par un large spectre de malformations, la plupart récapitulant tous les défauts congénitaux détectés chez les souris DVA (Lohnes *et al.*, 1994; Mendelsohn *et al.*, 1994). Ceci constitue une preuve génétique directe que l'AR est le dérivé actif de la vitamine A au cours du développement et que les effets de la vitamine A sont médiés par les RAR. Certaines malformations retrouvées chez les double mutants ne sont toutefois pas observées chez les souris DVA. Celles-là incluent l'exencéphalie, les anomalies squelettiques, certaines malformations oculaires, glandulaires et cartilagineuses, l'agénésie anale, ainsi que des malformations des doigts. Probablement le niveau de déficience compatible avec la vie est insuffisant pour générer ces malformations, d'où les différences observées.

Parallèlement, des souris  $RXR\alpha^{-/-}$  et  $RXR\beta^{-/-}$  et  $RXR\gamma^{-/-}$  ont été générées. Les mutants  $RXR\alpha^{-/-}$  possèdent une paroi ventriculaire hypoplastique (souvent qualifiée de myocarde 'spongieuse') et meurent entre les jours embryonnaires 10,5 et 17,5 dû à l'insuffisance cardiaque (Sucov *et al.*, 1994; Kastner *et al.*, 1994; Dyson *et al.*, 1995). Les myocytes ventriculaires  $RXR\alpha^{-/-}$  montrent une différenciation précoce, un taux de prolifération réduit et une morphologie anormale comparativement aux cardiomyocytes normaux (Kastner *et al.*, 1997). Puisque les mutants  $RAR\alpha^{-/-}/RAR\gamma^{-/-}$  sont également atteints d'hypoplasie ventriculaire (Mendelsohn *et al.*, 1994) et des mutants  $RAR/RXR\alpha^{-/-}$  montrent une augmentation accrue de la fréquence de ce phénotype, les hétérodimères RAR/RXR constituent vraisemblablement des unités fonctionnelles impliquées dans la transduction du signal des rétinoïdes *in vivo* (Kastner *et al.*, 1997b).

Curieusement, deux études récentes suggèrent que l'AR joue également une fonction au niveau du cerveau. La première étude découvre que les fonctions cognitives comme l'apprentissage et la mémoire sont affectées chez des mutants  $RAR\beta^{-/-}$  et  $RAR\beta^{-/-}/RXR\gamma^{-/-}$  (Chiang *et al.*, 1998). La deuxième étude démontre que des mutants simples  $RAR\beta^{-/-}$ ,  $RXR\beta^{-/-}$  et  $RXR\gamma^{-/-}$ , ainsi que des mutants doubles  $RAR\beta^{-/-}/RXR\beta^{-/-}$ ,  $RAR\beta^{-/-}/RXR\gamma^{-/-}$  et  $RXR\beta^{-/-}/RXR\gamma^{-/-}$  se caractérisent par des défauts de locomotion. Le contrôle du mouvement volontaire implique la signalisation par des récepteurs de la dopamine D1R et D2R dans le striatum, site d'expression de  $RAR\beta$ ,  $RXR\beta$  et  $RXR\gamma$ . Une analyse des double mutants énumérés ci-dessus révèle une baisse d'expression de 40% de D1R et D2R (Krezel *et al.*, 1998). Un RARE a été identifié dans le promoteur de D2R ce qui suggère que l'expression de ce gène pourrait être affectée par l'AR au niveau transcriptionnel (Samad *et al.*, 1997).

#### 6.4 La redondance fonctionnelle

Généralement, les mutations dans les récepteurs RAR ou RXR ne causent que des défauts très mineurs comparativement aux souris DVA. Ce phénomène est pour le moins surprenant, car il va carrément à l'encontre du modèle établi expliquant les effets multiples des rétinoïdes. Notamment, on croyait que cette diversité découlait du contrôle des gènes cibles par des combinaisons dimériques de différentes isoformes des RAR et des RXR dont l'expression était régulée de façon spatio-temporelle. La découverte que les mutations simples avaient peu ou pas d'effet et que des combinaisons de différentes mutations résultaient en un large spectre de malformations laisse suggérer que différents récepteurs étaient fonctionnellement redondants ou interchangeableables (Chambon, 1994).

D'une part, on pourrait s'imaginer que tous les récepteurs RAR se substituent les uns aux autres. Ainsi le contrôle spatio-temporel de l'expression de ces gènes serait requis pour atteindre une certaine concentration des récepteurs nécessaire pour l'activation des gènes cibles dans un type cellulaire donné. Toutefois, le degré de conservation des différentes isoformes à travers les vertébrés est tellement élevé, particulièrement dans la région A contenant le domaine d'activation AF-1, qu'il doit y avoir au moins une fonction spécifique pour chaque isoforme. Ceci est appuyé par les études démontrant que RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  possèdent des rôles distincts lors de la différenciation des cellules F9 (voir la section 6.2) (Boylan *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1995).

D'autre part, il est tout à fait concevable que des mutants simples possèdent des défauts correspondant à une fonction inutile au laboratoire, mais importante dans l'environnement naturel de l'animal (par exemple la résistance aux conditions climatiques). Dans un contexte évolutionniste, cette fonction lui procurerait un avantage net par rapport aux autres animaux. Alternativement, des défauts pourraient être très discrets, difficiles à détecter, comme, par exemple, une altération du comportement. L'exemple de la souris RAR $\beta$ <sup>-/-</sup> illustre bien cette

notion. L'analyse initiale a révélé que les souris mutantes sont viables et fertiles et que leur anatomie grossière et leur comportement sont normaux dans des conditions de laboratoire. Une analyse plus poussée a révélé qu'elles possédaient un défaut dans la locomotion par rapport aux souris de type sauvage. Les systèmes nerveux périphérique et central de ces souris sont parfaitement normaux lors du développement pré- et postnatal, exceptée la diminution de l'expression des récepteurs de la dopamine D1R et D2R dans le striatum ventral (Krezel *et al.*, 1998). En effet, il a déjà été démontré que l'expression de ces récepteurs est induite par les RAR (Samad *et al.*, 1997). Ainsi, une examination standard des souris mutantes a échoué dans l'identification de cette nouvelle voie neurochimique impliquant les RAR.

## **7 LE RÔLE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE DANS L'ÉTABLISSEMENT DE LA LATÉRALITÉ CHEZ L'EMBRYON**

Plusieurs études suggèrent que l'AR joue un rôle dans le développement de l'axe gauche-droite. La plupart démontrent que l'excès ou l'insuffisance d'AR perturbent la latéralité cardiaque. Chez l'embryon de poulet, l'implantation des billes imbibées d'AR ou du noeud de Hensen à gauche de l'axe antéro-postérieur au stade embryonnaire 4 induisent, entre autres, une inflexion anormale du tube cardiaque ou le *situs inversus* (Chen et Solursh, 1992; Dickman et Smith, 1996). Subséquemment, il a été démontré que les champs précardiaques gauche et droit diffèrent dans leur sensibilité à l'AR (Smith *et al.*, 1997). L'application de l'AR (25, 50 et 100µg/ml) dans le champ précardiaque droit causait une inflexion aléatoire du tube cardiaque, tandis que le traitement du côté gauche induisait le *situs inversus* seulement à de hautes concentrations (100µg/ml). De plus, deux protéines de la matrice extracellulaire cardiaque hLAMP-1 (heart-specific lectin-associated matrix protein 1) et JB3, une protéine apparentée à la fibrilline, sont distribuées asymétriquement au cours de la gastrulation chez le poulet. Chez des embryons normaux, hLAMP-1 est enrichie à gauche et JB3 est enrichie à droite.

Le traitement avec l'AR, en plus d'affecter l'inflexion du tube cardiaque, inverse la distribution de ces deux protéines (Smith *et al.*, 1997). Ces expériences indiquent que l'inflexion du tube cardiaque et la distribution des protéines de la matrice extracellulaire se retrouvent sous le contrôle des rétinoïdes.

Plusieurs défauts de latéralité ont été rapportés chez des rongeurs, des primates et des humains soumis à des doses élevées d'AR au cours de l'embryogenèse. Des hamsters et des rats traités avec un excès d'AR lors de la gastrulation présentent une fréquence de 20% d'hétérotaxie viscérale et thoracique (Shenefelt, 1972; Miura *et al.*, 1990). La même anomalie est induite chez la souris par le traitement au jour embryonnaire 6,5, à une fréquence de 43% (Yasui *et al.*, 1998). La dextrocardie est également observée chez les humains atteints du syndrome d'isotrétinoïne (Van Maldergem *et al.*, 1992) ainsi que d'autres primates exposés à un excès d'AR (Hendrickx *et al.*, 1980). Somme toute, l'AR, lorsqu'administré au cours de la gastrulation, peut causer un développement aléatoire de l'axe gauche-droite.

La déficience en rétinoïdes également perturbe l'établissement de la latéralité. La caille DVA présente un large spectre d'anomalies, dont une inversion de la position du coeur chez 65% d'embryons (Dersch et Zile, 1993; Twal *et al.*, 1995). Toutes les anomalies, y inclus le *situs inversus*, peuvent être prévenues par l'administration des dérivés actifs de la vitamine A jusqu'au stade 6-7 (équivalent au stade 7,75 chez la souris) (Dersch et Zile, 1993). Cette observation supporte fortement le rôle de l'AR endogène dans l'établissement de latéralité à la fin de la gastrulation.

L'existence d'une fenêtre de développement durant laquelle l'axe gauche-droite est sensible à l'AR a été confirmée par des expériences de culture d'embryons de souris *in vitro* en présence d'agonistes et d'antagonistes des RAR (Chazaud *et al.*, 1999). Notamment, environ la moitié d'embryons exposés à ces traitements au stade embryonnaire 7,75 montraient un *situs* cardiaque aléatoire.

Toutefois, lorsque le traitement était initié au stade présomitique (soit 4 heures plus tard), l'emplacement du coeur était normal. De plus, chez certains embryons traités avec l'antagoniste, une dilatation de la cavité cardiaque et l'absence de l'inflexion du tube cardiaque ont été observées. Ces malformations ont également été répertoriées chez le mutant de la souris déficiente en *raldh-2*, une enzyme impliquée dans la synthèse d'AR (Niederreither *et al.*, 1999), ce qui suggère que l'AR endogène est impliqué dans des étapes précoces de la cardiogenèse. On peut donc avancer l'hypothèse que, l'AR affecte deux voies indépendantes: une contrôlant la latéralité cardiaque et l'autre, le développement du coeur.

## 8 OBJECTIF DU TRAVAIL

Dans les cinq dernières années, de nombreux gènes impliqués dans l'établissement de l'axe gauche-droite ont été identifiés. Chez la souris, *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* et *pitx-2* montrent un patron d'expression asymétrique et leur rôle dans le développement de la latéralité est maintenant bien établi. Parallèlement, il a été démontré que l'AR, en plus d'affecter le développement cardiaque, influence le *situs* thoracique et viscéral de plusieurs espèces de vertébrés. L'action de l'AR semble cibler une fenêtre de développement bien précise qui précède l'expression des gènes impliqués dans l'établissement de l'axe gauche-droite. Le but du projet est donc d'étudier l'effet de l'AR sur l'expression des gènes impliqués dans la cascade de latéralité. Cette approche permettra d'identifier les cibles directes ou indirectes de l'AR et, par conséquent, de déterminer le rôle joué par l'AR dans le développement de l'axe gauche-droite chez la souris.

## CHAPITRE 2

### **PRÉSENTATION DU MANUSCRIPT**

## Retinoic Acid Affects Left-Right Patterning

Sylwia Wasiak<sup>§†</sup> and David Lohnes<sup>§††</sup>

From the Departments of §Molecular Biology, Université de Montréal, ‡Division of Experimental Medicine, McGill University, and †the Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 ave. des Pins, ouest, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7

\*to whom correspondence should be addressed to at Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins, ouest, Montréal , Québec, Canada, H2W 1R7, Fax (514) 987-5767; e-mail [lohnesd@ircm.qc.ca](mailto:lohnesd@ircm.qc.ca)

*Short Title:* RA and left-right patterning

## SUMMARY

Our knowledge of the means by which the left-right axis is patterned is largely incomplete, although a number of key intermediaries have been recently described. We report here that retinoic acid (RA) excess affects heart *situs* concomitant with alterations in the expression of genes implicated in the establishment of the left-right axis. Notably, RA exposure during a specific developmental window evoked bilateral expression of *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* in the lateral plate mesoderm. Time course experiments, together with analysis of midline markers, suggests that nascent mesoderm constitutes a predominant RA-target involved in this process. These events are likely to underlie the perturbations of heart looping provoked by excess RA, and suggest a means by which retinoids influence the early steps in establishment of the left-right embryonic axis.

*Key words:* Retinoic acid receptor, *lefty*, *pitx-2*, *nodal*, left-right, *situs inversus*, midline

## INTRODUCTION

Whereas the vertebrate body exhibits external bilateral symmetry, a number of internal organs display significant left-right (L-R) asymmetry, with the most obvious and earliest morphological manifestation of L-R asymmetry being the rightward looping of the developing heart. Asymmetric arrangement of internal organs is invariant within a given species and is conserved throughout evolution. The development of normal asymmetry, termed *situs solitus*, may be inverted, resulting in a mirror-image arrangement, either of the entire body plan (*situs inversus*) or of an individual organ (heterotaxia). Other defects of *situs*, corresponding either to aberrant bilateral symmetry or lack of normal asymmetry are called isomerisms.

A number of genes have been shown to be expressed asymmetrically relative to the L-R axis (for reviews see (Beddington et Robertson, 1999; Ramsdell et Yost, 1998; Harvey, 1998). In chick embryos, Levin *et al.* (1995; 1997) proposed a signaling cascade controlling L-R patterning. In this cascade, activin- $\beta$ B, present on the right side of stage 3-5+ embryos, causes a local induction of *activin type IIA receptor (cActRIIA)*, which in turn represses the expression of *sonic hedgehog (shh)* on the right of Hensen's node. An unknown relay factor X is hypothesized to then transmit the shh signal leftward and induce *nodal* expression in the left lateral plate mesoderm (LPM). In mouse, however, shh signaling has not been demonstrated to be involved in laterality specification. In contrast, the mouse homologue of *nodal* is asymmetrically expressed in the left LPM of the embryo (Collignon *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 1996). Two further TGF- $\beta$ -related genes involved in the determination of asymmetry, *lefty-1* and *lefty-2*, have also been identified in the murine embryo (Meno *et al.*, 1996; Meno *et al.*, 1997). Whereas *lefty-1* is predominately expressed in the left portion of the prospective floorplate (PFP), *lefty-2* is expressed in the left LPM in a similar fashion to that of *nodal*, and a number of studies suggest that *lefty-2* and/or *nodal* encode a signal for 'leftness' (Meno *et al.*, 1998). *Pitx-2*, a bicoid-related homeodomain transcription factor, is also expressed in the left LPM of the embryo and its expression persists in the left

region of several asymmetric organs. *Pitx-2* is thought to act downstream of *shh* and *nodal* and to interpret and subsequently execute the L-R developmental program (Ryan *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998).

A number of the factors implicated in L-R signaling during vertebrate embryogenesis exhibit a correlation between their expression in the LPM and visceral *situs*. For example, in *inv/inv* mice, where all animals exhibit *situs inversus*, *nodal* and *lefty-2* expression is only detected in the right LPM (Meno *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1996; Collignon *et al.*, 1996). In *iv/iv* mice, where L-R asymmetry is randomized, four possible patterns of *nodal* expression are observed: left, right, bilateral or absent (Lowe *et al.*, 1996), while *lefty-1* and *lefty-2* expression is left-sided, right-sided or bilateral (Meno *et al.*, 1997). *Nodal* expression is also bilateral in *Fused toes* and *no turning* mice which have randomized L-R polarity (Melloy *et al.*, 1998; Heymer *et al.*, 1997). These studies, and other work, demonstrate that changes in L-R patterning are often preceded by predictable modifications in the asymmetric pattern of several genes.

Several observations suggest a role for the midline in the maintenance of lateral asymmetry. Degeneration of the notochord in the mouse mutant *no turning*, or absence of the notochord in *Zebrafish* mutants *notail* and *floating head*, is correlated with randomized heart looping (Melloy *et al.*, 1998; Danos et Yost, 1996). Extirpation of the notochord or neural tube in *Xenopus* embryos also results in defects of *situs* (Lohr *et al.*, 1997). *HNF-3 $\beta$*  is a winged helix-loop-helix transcription factor expressed in the notochord and floorplate and required for node and notochord formation (Ang et Rossant, 1994), and *HNF-3 $\beta$ <sup>+/-</sup>/*nodal*<sup>LacZ/+</sup>* double-heterozygous mice also exhibit defects in the positioning of the viscera and heart, and random embryonic turning (Collignon *et al.*, 1996). The TGF- $\beta$  member *lefty-1* has been implicated in midline functions involved in dictating sidedness. *Lefty-1* is a gene expressed predominantly in a narrow strip of cells situated on the left side of the floorplate. Disruption of this gene results in aberrant expression of *pitx-2*, *lefty-2* and *nodal* and left thoracic isomerism (Meno *et al.*, 1998), consistent

with *lefty-1* mediating a midline 'barrier' function which may act to confine factors dictating 'leftness' to the appropriate side.

Retinoic acid (RA) is essential for diverse developmental processes in vertebrates (reviewed by Sporn *et al.*, 1994; Kastner *et al.*, 1995). A number of studies clearly demonstrate that either excess or deficiency in the retinoid signal results in laterality defects. In the chick embryo, both exogenous RA and grafted Hensen's node cause the host heart to loop in an abnormal direction (Dickman et Smith, 1996; Chen et Solursh, 1992). Additionally, RA affects asymmetric cardiac matrix protein expression in a manner which predicts its ability to randomize the direction of heart looping (Smith *et al.*, 1997). RA exposure during gastrulation also results in thoracic and visceral heterotaxia in hamsters (Shenefelt, 1972), mice (Irie *et al.*, 1990) and rats (Miura *et al.*, 1990), with a high incidence of *situs inversus* observed in the latter species. These observations suggest that RA excess can randomize the establishment of the L-R axis during gastrulation. Retinoid deficit can likewise affect L-R patterning, as *situs inversus* is observed in the majority of vitamin A-deficient (VAD) quail embryos (Dersch et Zile, 1993; Twal *et al.*, 1995). Interestingly, cardiac *situs inversus* can be rescued by administration of vitamin A-active compounds as late as neurulation stage 8 in such retinoid deficient avian embryos (Dersch et Zile, 1993). Finally, blocking RA signaling has recently been reported to inhibit expression of genes involved in L-R patterning, resulting in cardiac defects reminiscent of those seen in *raldh-2* deficient mice (Chazaud *et al.*, 1999; Niederreither *et al.*, 1999).

Taken together, the above observations demonstrate a role for RA in L-R specification. In the present study, we have identified the molecular events that precede perturbations of the heart tube looping observed in mice treated with excess RA. Notably, exogenous RA resulted in bilateral expression of *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* in the LPM, suggesting that RA acts upstream of these factors. Moreover, time course experiments, together with analysis of midline markers, suggests that nascent mesoderm constitutes a predominant RA-target involved in

this process. These events suggest a means by which retinoids influence the early steps in establishment of the left-right embryonic axis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Treatment

CD-1 mice were mated overnight and females examined the following day for the presence of a vaginal plug. Pregnant females were dosed by oral gavage with all-*trans* RA dissolved in DMSO with corn oil as a vehicle to a final delivery of 10 or 100 mg/kg maternal body weight at 7.5 or 7.75 days post-coitum (dpc; noon of the day of plug was considered 0.5 dpc). Animals were sacrificed 4 – 42 hours post-treatment and embryos dissected in phosphate buffered saline (PBS), fixed overnight in 4% paraformaldehyde, dehydrated through a methanol series and stored at -20°C in 100% methanol.

### In situ hybridization analysis

Embryos were pooled according to stage and RA treatment and rehydrated. Digoxigenin-labeled riboprobes were generated from plasmids encoding *lefty-1*, *lefty-2* (Meno *et al.*, 1997), *nodal* (Zhou *et al.*, 1993), *pitx-2* (J. Drouin, unpublished results), *p450RAI* (Abu-Abed *et al.*, 1998), *HNF-3 $\beta$*  (Sasaki *et al.*, 1994), *brachyury* (Wilkinson *et al.*, 1990), and *shh* (Echelard *et al.*, 1993) and used for whole-mount *in situ* hybridization analysis as previously described (Henrique *et al.*, 1995). Sense riboprobes were used to control for hybridization artifacts and embryos to be compared were processed in parallel, using the same probe(s), to control for inter-experimental variability in signal strength. Note also that the riboprobes used to assess *lefty-1* and *lefty-2* expression were specific. After *in situ* hybridization, embryos were cleared and photographed. Specimens were post-fixed in 4% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde at 4°C for 30 minutes, rinsed in several changes of PBS, embedded in Paraplast (Fisher) and sectioned. Developmental stage at time of gavage was estimated by the time of exposure (i.e. 4 or 12 hours) relative to the stage of the embryo at time of harvest. For example, a 2 somite embryo obtained 4 hours post-treatment was estimated to have been treated at the late-presomitic/early somite stage.

### **Cell Culture and Northern Blot Analysis**

F9 embryonal carcinoma cells were maintained in DMEM (Life Technologies) supplemented with glucose (4.5 g/liter), 10% fetal bovine serum and gentamicin (10 mg/ml). For routine culture, cells were passed every third day into gelatinized 100 mm tissue culture plates and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For Northern blot experiments, cells were seeded in 100 mm plates (approximately 10<sup>6</sup> cells/plate) and treated the following day with all-*trans* RA (1 μM) dissolved in DMSO (final volume 0.1%). Control cultures were treated with DMSO only. Cells were harvested 4-48 hours post-treatment, snap frozen and stored at -80°C prior to RNA extraction. Total RNA was extracted from cell pellets using Trizol (Life Technologies) according to the manufacturers directions. Fifteen μg of total RNA was resolved by electrophoresis through a formaldehyde gel and subjected to Northern blotting using Hybond N (Amersham) as described by the manufacturer. Hybridizations were performed overnight at 42°C in a formamide-based buffer (40% formamide, 0.9M sodium chloride, 50mM sodium phosphate, 2mM EDTA, 4X Denhardts, 0.1% SDS) supplemented with 0.1mg/ml denatured salmon sperm DNA with approximately 10<sup>6</sup> cpm/ml of denatured probe prepared by random priming. Blots were washed in 2X SSC/0.1% SDS three times at 65°C, followed by three washes in 0.2X SSC/0.1% SDS at the same temperature and signal revealed by autoradiography using X-Omat film (Kodak).

## RESULTS

### **RA affects looping of the heart tube**

Previous experiments have demonstrated that RA treatment at the primitive streak stage induced heterotaxia (mostly right isomerism) in the mouse (Yasui *et al.*, 1998). Moreover, RA administration at the post-looping stage (8.5 dpc) induces transposition of great arteries and other conotruncal anomalies not associated with heterotaxia in the mouse (Yasui *et al.*, 1995; Yasui *et al.*, 1997). However, the effects of *in vivo* RA treatment at the headfold stage (7.5 dpc) on left-right patterning of the heart have not been fully investigated at the molecular level. Several lines of evidence suggest that normal retinoid signaling has commenced at this stage of development (Krezel *et al.*, 1996; Duester, 1996; Rossant *et al.*, 1991). Furthermore, this embryonic stage coincides with the appearance of the first known asymmetrically expressed genes (reviewed in (Beddington et Robertson, 1999)). In order to investigate the consequences of RA treatment at 7.5 dpc on looping of the heart, we first treated pregnant females with a single dose of either 100 mg/kg or 10 mg/kg RA and analyzed embryos morphologically 42 hours later (9.25 dpc).

At the 100 mg/kg dose, various heart looping anomalies were noted in all embryos (n = 8). In most cases (7/8) a reversed leftward loop (l-loop) resulting in an abnormal rostro-caudal ventricular arrangement was observed (Fig. 3, D-F). At the 10 mg/kg dose, six out of ten hearts analyzed presented a primary rightward loop (d-loop) but with a cranial displacement of the bulbus cordis (future primitive right ventricle; Fig. 3, G-I). The remaining hearts presented normal morphology (primary d-loop) in which the primitive right and left ventricles were arranged laterally across the embryo, caudal to the outflow tract. These data demonstrated that RA administered at 7.5 dpc can significantly perturb the direction of cardiac looping and the spatial arrangement of different cardiac compartments.

### **RA induces the expression of genes implicated in the laterality pathway in F9 cells**

The induction of aberrant heart looping suggested that RA might affect the early molecular events controlling the establishment of laterality. In order to investigate this possibility, the effects of RA on the expression of genes implicated in the laterality pathway were first characterized using the F9 embryonal carcinoma cell line. Northern blot analysis of untreated F9 cells revealed detectable basal levels of *lefty-1*, *lefty-2* and *nodal*, whereas *pitx-2* transcripts were not observed (Fig. 4). Time-course experiments established that RA treatment resulted in an increase in *lefty-1* and *lefty-2* transcript levels within four hours post-treatment, whereas *pitx-2* message was induced after 12 hours. Although less affected, *nodal* transcripts exhibited a modest increase evident as early as 4 hours post-treatment. These data are consistent with previous studies demonstrating that RA induces *lefty-1* in P19 embryonal carcinoma cells (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1998; Meno *et al.*, 1996). Moreover, the sequential induction of *lefty-1/lefty-2* and *nodal*, followed by *pitx-2*, is consistent with the current model which places *pitx-2* downstream of *nodal* and *lefty-2* (Logan *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998), and suggests that this cascade also functions in F9 cells.

### **RA induces bilateral expression of left-sided markers in the mouse embryo**

Based on the above Northern analysis, we further investigated the relationship between retinoid signaling and L-R patterning *in vivo*. This was addressed by administration of exogenous RA to pregnant females at 7.5 or 7.75 dpc and by embryonic gene expression analysis using whole mount *in situ* hybridization 12 or 4 hours post-treatment, respectively.

Spatial and temporal patterns of *nodal* expression in untreated control embryos was as previously described (Lowe *et al.*, 1996; Collignon *et al.*, 1996) (Fig. 5A), with transcripts detected in two distinct areas, the node and the LPM. Briefly, at the 1-2 somite stage, expression was restricted to the ventral lateral regions surrounding the node, with transcripts gradually becoming slightly, but reproducibly, more pronounced to the left of the node by the 3 somite stage. By

the 4 somite stage, expression was also observed in the LPM adjacent to the node, with transcripts then spreading anteriorly with a rostral limit reaching the level of the developing heart by 5-6 somites. Transcripts were then progressively lost from the node and posterior lateral plate, with expression completely extinguished by the 7 somite stage.

As shown in Fig. 5B, in contrast to the normal pattern of expression, 12 hours following RA administration, ectopic expression of *nodal* was observed, with some 2 to 5 somite stage embryos displaying transcripts in the posterior right LPM. In other specimens, transcripts were confined to the left LPM but with a more posterior limit of expression than in untreated controls (data not shown). However, in the majority of specimens (12/16), the expression domain crossed the caudal midline with transcripts evident in the right LPM with a variable rostral limit. In some cases (2/12), this ectopic expression was more intense than normal left-sided domain, and occasionally persisted even after normal expression was lost from the node and left posterior LPM. Scattered *nodal*-positive cells were also observed across the midline and/or the node in the majority of treated embryos (14/16). In contrast to the effects of treatment on LPM expression, normal asymmetric transcript distribution around the node was maintained 12 hours post-treatment (compare e.g. Fig. 5A and B). At the 5- to 6-somite stage, strong ectopic bilateral expression was also observed in the headfold mesenchyme of most embryos (4/5; data not shown).

To further assess the effect of exogenous RA on L-R patterning, analysis was also performed 4 hours following treatment. As for longer exposures, this shorter exposure also resulted in bilateral *nodal* expression in the posterior LPM (5/6 3 to 5 somite embryos; Fig. 5C). However, the rostral extent of right-sided expression was often less pronounced than that observed 12 hours post-treatment (compare Fig. 5C to 5B). Interestingly, in contrast to longer treatment regimens, expression around the node was often perturbed, with 3 out of 6 embryos displaying

equivalent expression on both sides (e.g. left embryo in Fig. 5C) and 1 showing a greater expression domain on the right side (data not shown).

The expression of *lefty-2* in untreated embryos was as described (Meno *et al.*, 1996; Meno *et al.*, 1997)(Fig. 5D). Briefly, expression appeared at 3 somites in the LPM adjacent to the node and then spread anteriorly in a fashion similar to that of *nodal*. Expression became undetectable by 6 somites. In contrast to the normal pattern of expression, 12 hours following RA-gavage, variable bilateral expression of *lefty-2* was detected in the posterior LPM in the majority (5/7) of 3 to 4 somite embryos (Fig. 5E). A similar bilateral signal was also observed in the caudal embryo 4 hours post-exposure (5/7 embryos), but expression never expanded as anterior as that observed 12 hours post-treatment (compare Fig. 5E to 5F). In some specimens treated for 12 hours (2/7), scattered foci of expression were also observed along the midline. In 6-7 somite embryos, ectopic bilateral (3/10) or right-sided only (2/10) expression was also detected in the headfold mesenchyme (data not shown).

In untreated 3 to 4 somite embryos, *pitx-2* message was detected bilaterally in the headfold mesenchyme and in the left LPM, where expression extended along the antero-posterior axis in a manner resembling that of *lefty-2* and *nodal*, and consistent with previous analysis (Ryan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998)(Fig. 5G). In 3-4 somite embryos, RA induced bilateral expression of *pitx-2* in the posterior LPM in the majority of embryos 12 (6/9) or 4 (4/4) hours post-gavage (Fig. 5H and I). In 1 of 5 embryos at the 5-6 somite stage, bilateral expression of *pitx-2* was observed in both anterior and posterior LPM. Moreover, at the 5-6 somite stage, strong bilateral ectopic expression was also observed in the headfold mesenchyme in 1 out of 5 embryos (data not shown).

*Lefty-1* was first detected at 2 somites in the left half of the prospective floorplate (PFP), adjacent to the node. Subsequently, in untreated embryos, the expression spread anteriorly along the length of the PFP as described (Meno *et al.*, 1997)(Fig.

6A). In some experiments, low levels of *lefty-1* transcripts were also observed in the left LPM. As for *nodal*, RA treatment *in utero* affected *lefty-1* expression both 4 and 12 hours post-gavage (Fig. 6B and C). In the majority of 3 to 4 somite embryos examined, *lefty-1* transcripts were both elevated in the normal domain of left LPM expression and ectopically induced, with a bilateral expression pattern in the posterior LPM. In some cases, expression barely crossed the midline, while in others, a clear and more anterior right-sided signal was observed. *Lefty-1* expression in the PFP remained unaffected by treatment, and analysis of sections revealed that *lefty-1* transcripts remained restricted to the left side of the PFP irrespective of treatment (e.g. compare midline expression of untreated control in Fig. 6D to treated specimens in 6E and F).

The ability of RA to affect bilateral LPM expression of the 4 genes studied above was restricted to the window of their normal appearance in the left LPM (3 to 5 somites). Moreover, induction of bilateral expression was observed at comparable frequencies for all 4 markers (data not shown). It is also notable that ectopic right-sided expression was induced as early as 4 hours post-treatment. Therefore, as approximately one hour is required for maternally administered retinoid to begin to reach the embryo (Creech *et al.*, 1989; our unpublished results), expression of these genes is likely affected by RA in three hours or less.

#### **RA treatment affects midline markers**

Given the demonstrated importance of the notochord and the floorplate in L-R patterning, we next examined the expression of a number of genes known to be essential for the development of midline structures, including *HNF-3 $\beta$* , *shh* and *brachyury*. At 8.0 dpc, *HNF-3 $\beta$*  and *shh* both label the floorplate and the notochord (Ang et Rossant, 1994; Echelard *et al.*, 1993)(Fig. 7A,G and 7C,I respectively). Twelve hours after RA treatment at 7.5 dpc, *HNF-3 $\beta$*  transcripts were markedly up-regulated in the midline of 3-5 somite embryos, whereas *shh* was marginally induced (Fig. 7B and D, respectively). Analysis of sections revealed that, whereas *HNF-3 $\beta$*  appeared to be induced in both notochord and floorplate (Fig. 7H), *shh*

induction was less evident, and observed in the notochord and notochordal plate (Fig. 7J).

In untreated mice at 8.0 dpc, *brachyury* transcripts are located principally in the notochord, the primitive streak and associated nascent mesoderm (Wilkinson *et al.*, 1990; Kispert *et al.*, 1995)(Fig. 7E,K). Consistent with our previous work (Iulianella *et al.*, 1999), RA treatment attenuated *brachyury* expression marginally in the notochord and profoundly in nascent mesoderm at both 12 (Fig. 7F,L) and 4 hours post-treatment (data not shown). Notably, histological analysis of the above embryos revealed that, although the expression of these notochord and PFP markers was strongly altered, the physical integrity of these midline structures did not seem to be affected by RA, at least in the 12 hours following exposure.

## DISCUSSION

Prior studies have demonstrated the effects of RA excess or deficiency on cardiac development and the positional identity of cells within the heart tube. We report here that excess RA, administered during the presumptive headfold stage, also affects heart looping and that these changes are presaged by alterations in the expression of genes implicated in the establishment of the L-R axis. Moreover, these effects are accompanied by perturbed expression of the midline markers *brachyury*, *HNF-3 $\beta$*  and, to a lesser extent, *shh*. Taken together with the high incidence of cardiac *situs* defects in VAD quail embryos, and the developmental window during which RA can rescue these malformations (Dersch et Zile, 1993), our data suggest that RA influences early steps which establish the L-R embryonic axis. However, as discussed below, our findings also indicate that normal and excess retinoid signaling affects this process through two distinct mechanisms.

In VAD quail embryos, cardiac looping defects are prevalent, and can be rescued by administration of RA at stage 8 (equivalent to mouse late headfold stage). This period coincides with both the onset of expression of enzymes involved in RA biosynthesis (e.g. *adh4* and *raldh-2*) (Ang *et al.*, 1996; Duester, 1996) and the appearance of bioactive retinoids in chick and mouse embryos (Maden *et al.*, 1998; Rossant *et al.*, 1991). Notably, *raldh-2* null embryos are markedly deficient in RA activity, and exhibit a linear, dilated, heart (Niederreither *et al.*, 1999). This cardiac defect can also be evoked by administration of a pan-RAR antagonist to cultured headfold-stage mouse embryos, and occurs concomitant with loss of expression of certain left-right markers (Chazaud *et al.*, 1999). Taken together, these data offer convincing evidence that RA plays a role in L-R patterning at the headfold stage. That this may occur *via* an impact on the transcription of genes involved in L-R patterning is supported by our present observation that excess RA resulted in aberrant expression of *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* and *pitx-1*. The finding that ectopic expression of these genes occurred at approximately the same frequency in stage-matched embryos is consistent with these factors acting in the same

molecular pathway (reviewed in (Beddington et Robertson, 1999; Harvey, 1998), and supports a role for RA in events upstream or parallel to this cascade (see also below). Interestingly, the period during which RA was able to affect bilateral expression of these genes was restricted to their normal period of expression in the left LPM; as discussed above, this stage also corresponds to the period of presumed function for RA in L-R patterning (Kostetskii *et al.*, 1998; Dersch et Zile, 1993).

When this manuscript was in preparation, a similar study was reported (Chazaud *et al.*, 1999). Our findings of the effects of RA excess on expression of genes in the L-R patterning cascade are largely in agreement with this report. However, in the present study, we have found that RA altered expression of *nodal* in the region of the node, and did not find evidence for any effects of treatment on expression of *lefty-1* in the PFP. These discrepancies may be ascribed to methodological differences, as our work was done exclusively *in vivo* whereas Chazaud *et al.* used embryo culture. This may lead to appreciable differences in retinoid concentration, as well as embryonic stage of exposure. We also differ from Chazaud *et al.* in our interpretation of the effects of RA excess on L-R patterning. We suggest that the effect of RA excess is not reflecting a normal requirement for retinoid signaling in this pathway, but rather a pharmacological impact on a midline barrier function, as discussed below.

#### **Potential mechanisms of RA function in aberrant L-R patterning**

*Pitx-2*, the most distal player identified to date in the L-R pathway, can be induced by *nodal* or *lefty-2* in the chick embryo (Ryan *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 1998). This suggests that a RA-sensitive mechanism could result in alteration of *pitx-2* expression *via* effects on *nodal* or *lefty-2*, which would explain the similar expression pattern of these three genes following treatment. Moreover, recent analysis of *nodal* and *lefty-2* promoters indicates that these genes are controlled by similar *cis*-regulatory elements and in a manner distinct from that of *lefty-1* (Adachi *et al.*, 1999), suggesting that RA may impact on these promoters in

a comparable manner. Interestingly, we observed subtle, yet reproducible, effects of RA on *nodal* expression whereby its normal predominant expression on the left side of the node was lost. This may suggest that RA impacts on factors upstream of *nodal* involved in establishment of this expression domain, with subsequent secondary effects on gene expression transmitted to the left LPM. In addition to this, it is possible that the effects of treatment on expression of *lefty-1* in LPM may be explained by direct effects through an RARE in the *lefty-1* promoter (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1998).

We observed a similar temporal cascade in F9 cell line treated with RA, where *lefty-1* and *lefty-2*, and to a lesser extent, *nodal* mRNA levels were induced beginning 4 hours post-treatment, while *pitx-2* was induced 8 hours later. This observation suggests that the events affecting *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* expression *in vivo* are also reflected in F9 cells, and offer the potential of using this system as a model to further explore this relationship.

Although the above mechanisms are suggestive of possible means by which RA may affect L-R patterning, it is unclear how this actually occurs. There is no evidence for asymmetric expression of either RA or of any of the genes involved in its biosynthesis. The expression of P450RAI, an enzyme implicated in RA catabolism, also does not appear to be laterally biased in its expression (Fujii *et al.*, 1997) (and our unpublished observations). Thus, the most plausible means by which RA could normally play a role in affecting L-R gene expression would appear to be a permissive role in conjunction with a laterally-restricted factor.

Based on our findings, we propose two mechanisms to account for the effects of RA on expression of L-R genes. The first pertains to posteriorization of expression on the proper (left) side which we relate to a normal retinoid function. The second relates to induction of bilateral expression, which we suggest is due to an altered posterior midline barrier function. In the first instance, the finding of ectopic expression in the posterior embryo suggests that RA is imparting effects on

nascent mesoderm. Such a possibility is supported by time-course experiments, which demonstrated down-regulation of *brachyury* transcripts in the primitive streak region 4 or 12 hours post-treatment. Based on this, it is tempting to speculate that the posterior expansion of left-sided expression may be due to increased levels of RA which act to precociously induce targets, resulting in premature, but normal-sided gene expression. Such a potential mechanism would relate to the normal function of RA, with retinoid signaling impacting on left LPM gene expression, but at more rostral levels.

The second mechanism relates to right-sided ectopic gene expression. The above model may be valid for normal RA signaling in L-R patterning. However, it cannot explain the means by which excess RA elicits bilateral gene expression unless the laterally-restricted factor is also ectopically induced by treatment. Such an outcome is unlikely, as RA is apparently uniformly distributed in the embryo, and would therefore be expected to bilaterally induce such a factor under normal situations. Another possible target for such an effect is the midline. It is now well established that the PFP and the notochord play an important role in the leftward restriction of laterality information. For example, degeneration of the notochord in mouse mutant *no turning* leads to mis-expression of *lefty-2* and *nodal* in the right LPM (Melloy *et al.*, 1998). Moreover, lack of *lefty-1* expression in the PFP results in bilateral expression of *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* (Meno *et al.*, 1998). In the present report, although RA altered levels of *HNF-3 $\beta$*  and *shh*, the expression was induced, arguing against degeneration of the midline. Furthermore, the L-R identity of the PFP was likely correctly specified, as judged by *lefty-1* expression, suggesting that the presumptive barrier is functional. This finding may relate to the inability of RA to induce right-sided gene expression rostral to the node in our studies.

In contrast, based on the effects of treatment on nascent mesoderm, it is conceivable that RA is affecting a 'pre-notochordal' barrier in the caudal embryo. The variable extent of ectopic expression of all genes tested would then depend on the length of time post-exposure, whereby RA induces left LPM properties in

the right caudal embryo as a consequence of the loss of this hypothetical barrier. Our findings, together with other observations, therefore suggest that the outcome of RA excess on L-R gene expression is reflecting both normal and teratogenic processes, the precise nature of which is the focus of future studies.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to express their gratitude to Drs. J. Drouin, H. Hamada, B. Herrmann, B. Hogan, M. Kuehn and A. McMahon for the gifts of cDNAs; C. Charbonneau for assistance with photography; P. Champagne and D. Allan for critical reading of the manuscript and members of the laboratory for their thoughtful comments. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. S.W. was supported by a scholarship from the FCAR/FRSQ. D.L. is an MRC scholar.

## REFERENCES

Abu-Abed, S.S., Beckett, B.R., Chiba, H., Chithalen, J.V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P. and Petkovich, M. (1998) Mouse p450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 2409-2415.

Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A., Hamada, H. (1999) Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 promoter. *Genes and Dev.* **13**, 1598-1600

Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombicknight, M. and Duyster, G. (1996) Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class iv alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 9526-9534.

Ang, S.L. and Rossant, J. (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561-574.

Beddington, R.S.P. and Robertson, E.J. (1999) Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* **96**, 195-209.

Chazaud, C., Chambon, P. and Dollé, P. (1999) Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development* **126**, 2589-2596.

Chen, Y. and Solursh, M. (1992) Comparison of Hensen's node and retinoic acid in secondary axis induction in the early chick embryo. *Dev. Dyn.* **195**, 142-151.

Collignon, J. Varlet, I. and Robertson, E.J. (1996) Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* **381**, 155-158.

Creech Kraft, J. Lofberg, B. Chahoud, I. Bochert, G. and Nau, H. (1989) Teratogenicity and placental transfer of all-trans-, 13-cis-, 4-oxo-all-trans-, and 4-oxo-13-cis-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* **100**, 162-176.

Danos, M.C. and Yost, H.J. (1996) Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 96-103.

Dersch, H. and Zile, M.H. (1993) Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev. Biol.* **160**, 424-433.

Dickman, E.D. and Smith, S.M. (1996) Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev. Dyn.* **206**, 39-48.

Duester, G. (1996) Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome p450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**, 12221-12227.

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.

Fujii, H., Sato, T., Kaneko, S., Gotoh, O., Fujiikuriyama, Y., Osawa, K., Kato, S. and Hamada, H. (1997) Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel p450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* **16**, 4163-4173.

Harvey, R.P. (1998) Links in the left/right axial pathway. *Cell* **94**, 273-276.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. and Ish-Horowicz, D. (1995) Expression of a delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-790.

Heymer, J., Kuehn, M. and Ruther, U. (1997) The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant ft suggests a function in the establishment of handedness. *Mech. Dev.* **66**, 5-11.

Irie, K., Ando, M. and Takao, A. (1990) Bockman, E.E. and Kirby, M.L. (Eds.) *Embryonic Origins of Defective Heart Development*, pp. 387-388. N.Y. N.Y. Acad.Sci.

Iulianella, A., Beckett, B., Petkovich, M. and Lohnes, D. (1999) A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev. Biol.* **205**, 33-48.

Kastner P., Mark M. and Chambon P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859-69.

Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J. and Herrmann, B.G. (1995) The chick brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Dev. Biol.* **168**, 406-415.

Kostetskii, I., Yuan, S.Y., Kostetskaia, E., Linask, K.K., Blanchet, S., Seleiro, E., Michaille, J., Brickell, P. and Zile, M. (1998) Initial retinoid requirement for early avian development coincides with retinoid receptor coexpression in the precardiac

fields and induction of normal cardiovascular development. *Dev. Dyn.* **213**, 188-198.

Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P. and Chambon, P. (1996) Rxr-gamma null mice are apparently normal and compound RXR-alpha(+/-)/RXR-beta(-/-)/RXR-gamma(-/-) mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9010-9014.

Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M. and Tabin, C. (1995) A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-814.

Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R. and Tabin, C.J. (1997) Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.* **189**, 57-67.

Logan, M., Pagan-Westphal, S.M., Smith, D.M., Paganessi, L. and Tabin, C.J. (1998) The transcription factor pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals. *Cell* **94**, 307-317.

Lohr, J.L., Danos, M.C. and Yost, H.J. (1997) Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development* **124**, 1465-1472.

Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V.E., Potter, S.S., Overbeek, P. and Kuehn, M.R. (1996) Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**, 158-161.

Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T. and Gale, E. (1998) The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development* **125**, 4133-4144.

Melloy, P.G., Ewart, J.L., Cohen, M.F., Desmond, M.E., Kuehn, M.R. and Lo, C.W. (1998) No turning, a mouse mutation causing left-right and axial patterning defects. *Dev. Biol.* **193**, 77-89.

Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. and Hamada, H. (1996) Left-right asymmetric expression of the TGF-beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-155.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S. and Hamada, H. (1997) Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in xenopus embryos. *Genes to Cells* **2**, 513-524.

Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998) Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* **94**, 287-297.

Miura, S., Miyagawa, S., Morishima, M., Ando, M. and Takao, A. (1990) Retinoic acid-induced viscerotrial heterotaxy syndrome in rat embryos. In: Clark, D.B. and Takao, A. (Eds.) *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. pp. 467-484. NY: Futura, Mount Kisco.

Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P. and Chambon, P. (1999) Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genet.* **21**, 444-448.

Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Mattei, M.G., Dollé, P. and Chambon, P. (1998) Stra3/lefty, a retinoic acid-inducible novel member of the transforming growth factor-beta superfamily. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 23-32.

Ramsdell, A.F. and Yost, H.J. (1998) Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *TIG* **14**, 459-465.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M. and Giguere, V. (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacz transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes and Dev.* **5**, 1333-1344.

Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguezesteban, C., Yoneitamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., Delapena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D.P., Robertson, E.J., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. and Belmonte, J.C.I. (1998) Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-551.

Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A. and Hamada, H. (1999) Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2. *Genes and Dev.* **13**, 259-269.

Sasaki, H. and Hogan, B.L. (1994) Hnf-3 beta as a regulator of floorplate development. *Cell* **76**, 103-115.

Shenefelt, R.E. (1972) Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* **5**, 103-18:

Smith, S.M., Dickman, E.D., Thompson, R.P., Sinning, A.R., Wunsch, A.M. and Markwald, R.R. (1997) Retinoic acid directs cardiac laterality and the expression of early markers of precardiac asymmetry. *Dev. Biol.* **182**, 162-171.

Sporn, M.B., Roberts, A.B. and Goodman, D.S. (1994). In *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. New York: Raven Press Ltd.

Twal, W., Roze, L. and Zile, M.H. (1995) Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo. *Dev. Biol.* **168**, 225-234.

Wilkinson, D.G., Bhatt, S. and Herrmann, B.G. (1990) Expression pattern of the mouse *t* gene and its role in mesoderm formation. *Nature* **343**, 657-659.

Yasui H., Nakazawa M., Morishima M., Miyagawa-Tomita S. and Momma K. (1995) Morphological observations on the pathogenetic process of transposition of the great arteries induced by retinoic acid in mice. *Circulation* **91**, 2478-2486

Yasui, H., Nakazawa, M., Morishima, M., Ando, M., Takao, A. and Aikawa, E. (1997) Cardiac outflow tract septation process in the mouse model of transposition of the great arteries. *Teratology* **55**, 353-363.

Yasui H., Morishima M., Nakazawa M. and Aikawa E. (1998) Anomalous looping, atrioventricular cushion dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryos with right isomerism induced by retinoic acid. *Anat. Rec.* **250**, 210-219

Yoshioka, H., Meno, C., Koshiba, K., Sugihara, M., Itoh, H., Ishimaru, Y., Inoue, T., Ohuchi, H., Semina, E.V., Murray, J.C., Hamada, H. and Noji, S. (1998) *Pitx2*, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry. *Cell* **94**, 299-305.

Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L. and Kuehn, M.R. (1993) *Nodal* is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 3.** Frontal (A, D, G), right lateral (B, E, H) and left lateral (C, F, I) views showing the morphology of heart tube looping observed at E9.25, 42 hours post-gavage with either carrier (A-C), 100mg/kg (D-F) or 10 mg/kg (G-I) RA. Note the aberrant heart tube looping with rostro-caudal rather than left-right arrangement of the left and right primitive ventricles in embryos treated with 100mg/kg RA (D-F), with a milder defect evident in the lower dose specimens (G-I). Arrowhead, interventricular groove; L, left primitive ventricle; R, right primitive ventricle. Magnification: 3.2X.

**Figure 4.** Northern blot analysis of *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* expression in murine F9 embryonal carcinoma cells. F9 cells cultured as described in Materials and Methods were incubated for 0, 4, 8, 12, 24 or 48 hours in the presence of  $10^{-6}$  M RA. Northern Blots were probed with  $^{32}$ P-labeled cDNA corresponding to mouse *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* sequences. The blots were rehybridized with a  $\beta$ -actin cDNA to monitor the amount of RNA in each sample. Molecular weight marker positions are shown.

**Figure 5.** Effect of RA on *lefty-2*, *nodal* and *pitx-2* expression *in vivo*. Pregnant females were treated with either carrier (A, D, G) or RA at 100mg/kg (B, C, E, F, H, I). Embryos were isolated either 12 hours (B, E, H) or 4 hours (C, F, I) post-treatment. *Nodal* (A-C), *lefty-2* (D-F) and *pitx-2* transcripts (G-I) were detected by whole-mount *in situ* hybridization. All specimens were photographed from a posterior ventral view. Arrowheads indicate the extent of gene expression in the LPM. hf, headfold; L, left side; lpm, lateral plate mesoderm; n, node; R, right side. Magnification: 6.4X.

**Figure 6.** RA does not affect the expression of *lefty-1* in the prospective floorplate. Pregnant females were treated with either carrier (A, D) or RA at 100mg/kg (B, C, E, F). Embryos were isolated either 12 hours (B, F) or 4 hours (C, F) post-

treatment and analyzed by whole-mount *in situ* hybridization. Note that the expression in the LPM is bilateralized in the posterior portion after RA treatment. Arrowheads indicate the extent of *lefty-1* expression in the LPM. All specimens were photographed from a posterior ventral view. (D-F) Transverse sections through either a control embryo (D) or embryos treated for either 12 hours (E) or 4 hours (F). L, left side; lpm, lateral plate mesoderm; pfp, prospective floorplate; R, right side. Magnification: 6.4X (A, B, C), 300X (D, E, F) 450X (inserts, D, E, F).

**Figure 7.** Effects of RA treatment on the midline markers. Embryos were treated *in utero* with either carrier (A, C, E) or RA at 100mg/kg (B, D, F) and analyzed by whole-mount *in situ* hybridization 12 hours post-treatment. RA treatment up-regulated *HNF-3 $\beta$*  (A compared to B) and *shh* (C compared to D) expression while it down-regulated *brachyury* expression (E compared to F). All specimens were photographed from a ventral view. (G-L) Corresponding transverse sections showing *HNF-3 $\beta$*  (G, H), *shh* (I, J) and *brachyury* (K, L) expression in control and RA treated embryos. Dashes in A-F indicate the level of the section. Note that the apparent equivalent expression for *brachyury* is due to sectioning through the notochordal plate to demonstrate the normal coalescence and expression in this region; more anterior (notochordal) expression was extinguished by treatment. h, headfold; n, node; ne, neurectoderm; no, notochord; pfp, prospective floorplate; px, paraxial mesoderm. Magnification: 4X (A-F), 600X (G-L).

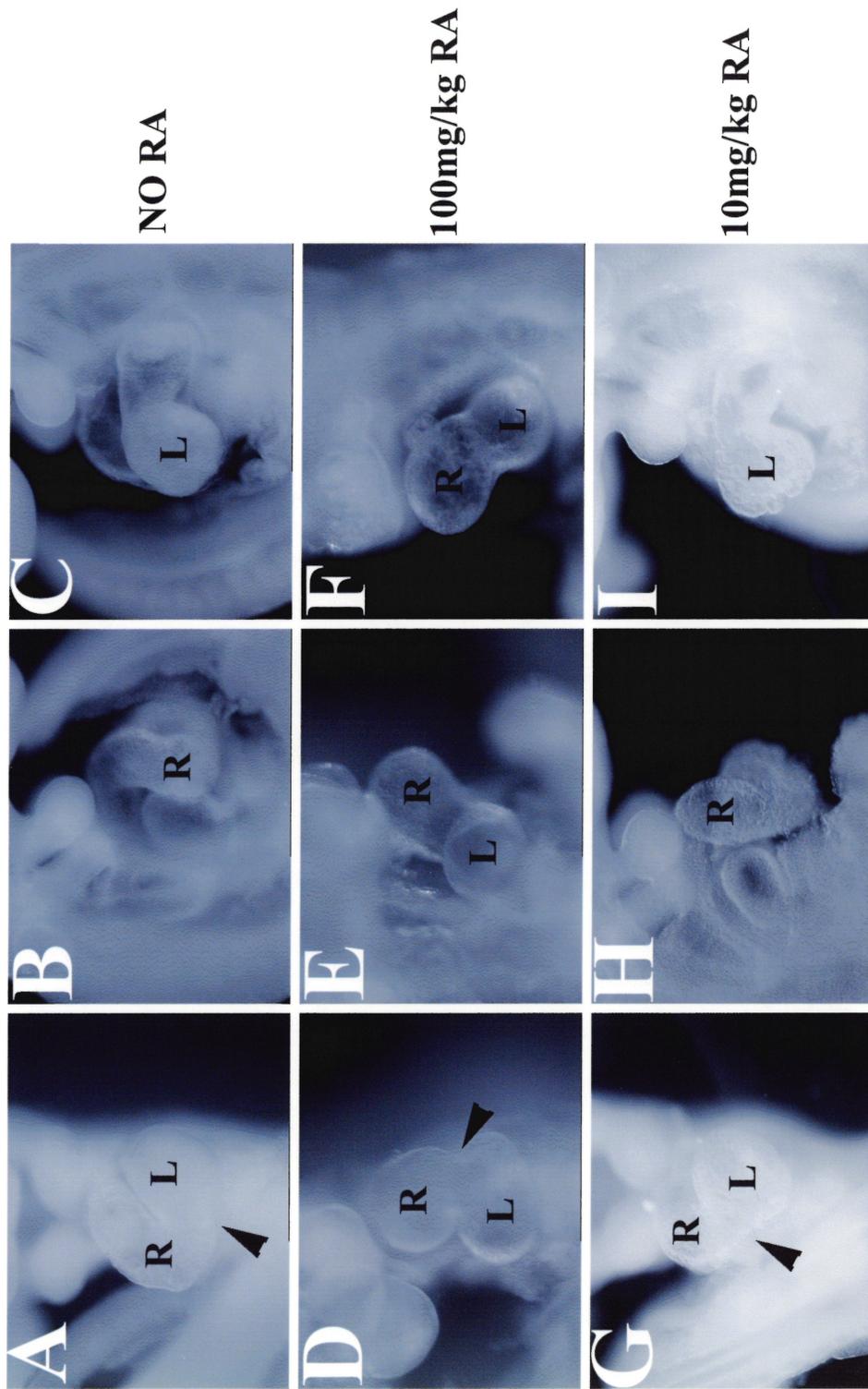


Figure 3

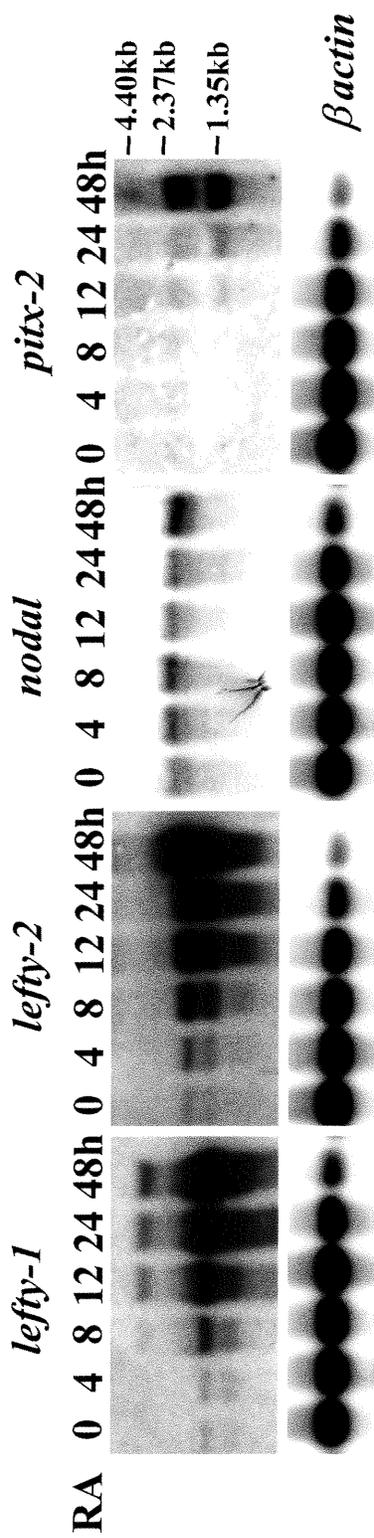


Figure 4

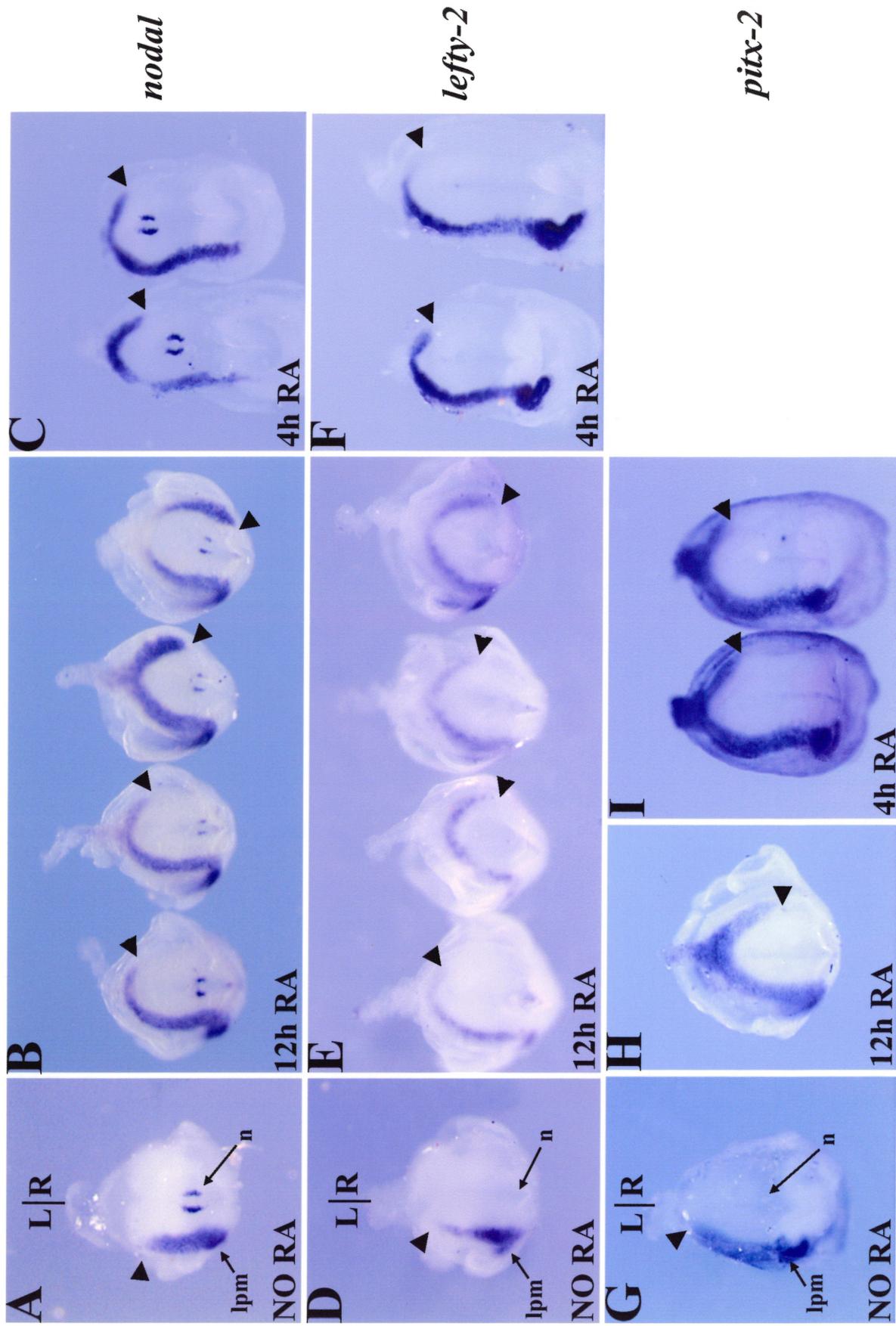


Figure 5

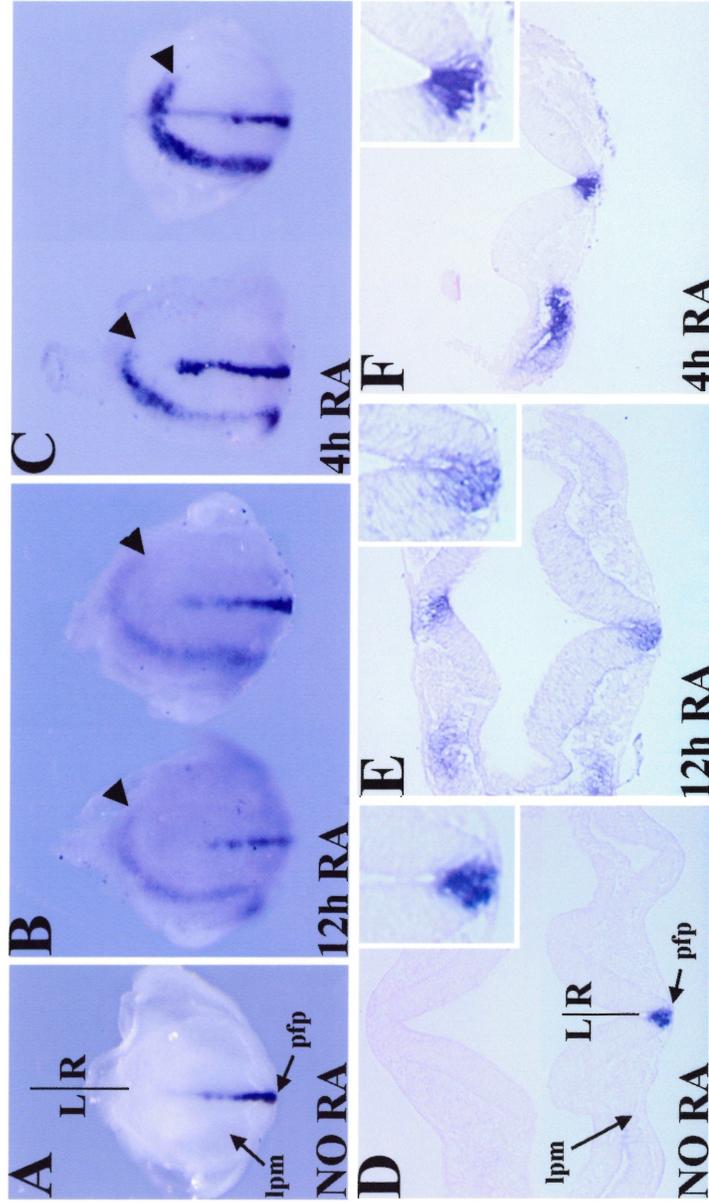


Figure 6



CHAPITRE 3

**DISCUSSION ET CONCLUSION**

Les maladies congénitales se manifestent par une série de malformations très variables du point de vue phénotypique. Dans le cas du coeur, la perturbation d'un seul événement moléculaire lors du développement précoce déclenche une cascade de malformations qui mènent à des défauts tellement complexes qu'il est parfois difficile d'en identifier la cause primaire.

L'exemple du développement de l'axe gauche-droite illustre bien cette notion. L'inflexion vers la droite place les segments du tube cardiaque, qui vont éventuellement former les oreillettes et les ventricules, dans leur orientation spatiale respective. Lorsque cet événement est perturbé, des anomalies complexes surgissent impliquant des compartiments cardiaques ainsi que des cloisonnements, des valvules et de gros vaisseaux sanguins. Dans certains cas, le phénotype résultant porte à croire qu'il s'agit d'une perturbation intrinsèque au coeur. Curieusement, les découvertes des dernières années indiquent que la latéralité du coeur dépend d'une série de gènes activés dans les cellules non-cardiaques avant même l'apparition du coeur primitif. L'élucidation des événements de développement précoce impliqués dans la formation du coeur et de l'axe gauche-droite amènerait donc une meilleure compréhension des défauts congénitaux ainsi que des relations existant entre eux.

Des observations provenant de différentes espèces de vertébrés démontrent indéniablement que la vitamine A joue un rôle important dans le développement et la latéralité cardiaques. Toutefois, son mécanisme d'action est encore peu connu. Dans une telle optique, nous nous sommes attardés sur la fonction potentielle des rétinoïdes dans l'établissement de la latéralité chez l'embryon de souris. Nous avons démontré que des doses pharmacologiques d'AR, en plus d'affecter la latéralité cardiaque, influencent l'expression des gènes impliqués dans le développement de l'axe gauche-droite chez la souris. Notamment, suivant le traitement, l'expression de *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* et *pitx-2* devient bilatérale dans la lame latérale. Ces perturbations sont vraisemblablement à l'origine des anomalies cardiaques observées chez les souris soumises à un

excès d'AR. Somme toute, nos observations suggèrent que les rétinoïdes influencent des événements précoces cruciaux pour l'établissement de l'axe gauche-droite.

## 1 LA FENÊTRE DE DÉVELOPPEMENT CIBLÉE PAR L'AR

Nous démontrons que l'AR perturbe l'axe gauche-droite lorsque administré maternellement au jour embryonnaire 7,75. Cette observation suggère l'existence d'une fenêtre où l'axe gauche-droite est susceptible à l'action de l'AR. Deux expériences indépendantes supportent cette possibilité. Premièrement, la culture d'embryons de souris *in vitro* en présence d'AR cause le *situs inversus* seulement lorsqu'elle est initiée au stade embryonnaire 7,75, mais pas au stade 8,0. De plus, le traitement avec l'antagoniste des RAR, initié au même stade, abolit l'expression de *lefty*, *nodal* et *pitx-2* (Chazaud *et al.*, 1999). Deuxièmement, chez l'embryon de caille DVA, on peut prévenir des malformations cardiaques, y inclus le *situs inversus*, par l'administration des dérivés actifs de la vitamine A seulement jusqu'au stade correspondant à 7,75 jpc chez la souris (Dersch et Zile, 1993). En somme, ces résultats supportent le rôle de l'AR endogène dans l'établissement de la latéralité à la fin de la gastrulation.

D'ailleurs, c'est au stade 7,75 que l'AR devient détectable dans la région postérieure de l'embryon, dans les trois feuillets embryonnaires, plus précisément autour du noeud et de la ligne primitive (Rossant *et al.*, 1991). L'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de l'AR, ainsi que l'expression des récepteurs RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  est également initiée à ce stade (*adh-4*, *aldh-1* et *raldh-2*) (Ang et Duester, 1997; Zhao *et al.*, 1996; Niederreither *et al.*, 1997; Ang et Duester, 1997). Ainsi, toute la machinerie de signalisation des rétinoïdes est bien en place durant cette période présumée où l'AR peut affecter l'axe gauche-droite.

## 2 L'AR ET LA PERTURBATION DE L'AXE GAUCHE-DROITE

Comment l'AR pourrait-il influencer la cascade de latéralité? L'AR semble agir en amont de *lefty*, *nodal* et *pitx-2* de façon similaire aux gènes *iv* et *inv*. Une étude récente par Chazaud *et al.* (1999) démontre que la culture d'embryons de souris *in vitro* en présence d'un antagoniste des RAR abolit l'expression de *lefty*, *nodal* et *pitx-2* dans la lame latérale. Ceci suggère que les rétinoïdes pourraient contrôler l'expression de ces gènes au niveau transcriptionnel de façon directe ou indirecte.

L'analyse des régions promotrices de *lefty-2* et *nodal* révèle que ces gènes se retrouvent sous le contrôle des éléments régulateurs semblables (Adachi *et al.*, 1999). L'AR pourrait donc avoir un effet similaire sur ces deux promoteurs. L'expression de *pitx-2*, l'effecteur de la cascade de latéralité, peut être induite par *shh*, *lefty-1*, *lefty-2* et *nodal* chez l'embryon de poulet (Yoshioka *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Logan *et al.*, 1998). Si l'on assume que, chez la souris, *lefty-2*, *nodal* et *pitx-2* agissent dans la même voie de signalisation, une perturbation de l'expression de *lefty-2* et/ou *nodal* par l'AR causerait également une expression aberrante de *pitx-2*. Nous observons que l'AR induit l'expression ectopique des gènes *lefty*, *nodal* et *pitx-2* avec une fréquence semblable ce qui corrobore le modèle qui place ces gènes dans la même voie de signalisation. Une cascade temporelle similaire est observée dans les cellules F9 traitées avec l'AR. Plus précisément, l'expression de *lefty* et *nodal* est induite après 4 heures de traitement, tandis que l'expression de *pitx-2* est induite 8 heures plus tard. Même si on ne sait pas à quel point cette présumée cascade reflète les événements *in vivo*, les cellules F9 pourraient constituer un système intéressant pour l'étude de la relation entre différentes composantes de la voie de latéralité. Entre autres, il serait possible de déterminer s'il s'agit vraiment d'une induction séquentielle des gènes *lefty-2/nodal* et *pitx-2*.

L'effet de l'AR sur l'expression des gènes étudiés pourrait être direct, via un RARE, ou indirect, impliquant l'induction d'un facteur intermédiaire. Cette première option est tout à fait plausible dans le cas de *lefty-1* et *nodal*. *Lefty-1* est un gène induit par l'AR dans les cellules P19. Son promoteur contient, entre autres éléments régulateurs, un RARE palindromique constitué de deux demi-sites séparés par huit bases. Cet élément atypique se lie aux RAR recombinants et promouvoit la transactivation par RAR $\alpha$ 1 lorsque combiné à un promoteur hétérologue dans les cellules Cos-1 (Oulad-Abdelghani *et al.*, 1998). Nos expériences montrent que l'expression de *lefty-1* est affectée par l'AR uniquement dans la lame latérale et pas dans le plancher du tube neural. Le promoteur de *lefty-1* contient des éléments séparés qui dirigent l'expression du gène dans ces deux domaines distincts (Saijoh *et al.*, 1999). Une collaboration pourrait donc exister entre le RARE et l'élément dirigeant l'expression dans la lame latérale gauche, d'où une perturbation spécifique à ce domaine d'expression. L'analyse récente de l'élément 'enhancer' asymétrique de *nodal* a révélé que, parmi d'autres éléments de réponse, il contient un RARE potentiel (Norris et Robertson, 1999). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'AR exerce un contrôle transcriptionnel direct sur *lefty-1* et *nodal*. Toutefois, l'importance *in vivo* des RARE identifiés dans les promoteurs de ces gènes n'a pas encore été démontrée. Des expériences supplémentaires tels que l'inactivation génique de ces éléments de réponse chez la souris permettraient d'évaluer l'importance de l'impact direct de l'AR sur les promoteurs de *lefty-1* et *nodal in vivo*.

La deuxième option, impliquant un facteur intermédiaire répondant à l'AR, est probablement plus réaliste, car elle est mieux supportée par des données expérimentales. Dans un système de culture *in vitro*, une expression bilatérale de *lefty* est observée lorsque les embryons de souris sont d'abord exposés à l'AR pendant quatre heures et ensuite incubés avec l'antagoniste des RAR pendant six heures, jusqu'au stade de 3-4 somites (Chazaud *et al.*, 1999). Dans cette situation, un facteur encore inconnu, induit par l'AR, induirait à son tour l'expression de *lefty*. Certains ont avancé l'hypothèse que l'expression de *lefty-2* et *nodal* est sous le

contrôle d'un facteur X, induit par des signaux provenant des gènes *iv* et *inv* (Meno *et al.*, 1998). Exprimé avant *lefty-2* et *nodal*, ce facteur pourrait donc être la cible de l'AR.

Il existe également une troisième possibilité. Notamment, l'expression bilatérale des gènes *lefty*, *nodal* et *pitx-2* pourrait être secondaire à la perturbation des signaux asymétriques autour du noeud due au traitement avec l'AR. Chez certains spécimens, l'expression de *nodal* devient égale des deux côtés ou renforcée du côté droit du noeud après le traitement. L'AR semble donc affecter des signaux contrôlant l'expression de *nodal* autour du noeud. L'information asymétrique incorrecte serait alors transmise par le noeud au mésoderme latéral, ce qui résulterait en une expression bilatérale de *lefty-1*, *lefty-2*, *nodal* et *pitx-2* dans la lame latérale. Une situation similaire est observée chez l'embryon de poulet lorsque *shh* est exprimé ectopiquement du côté droit du noeud. On assiste alors à une induction ectopique des gènes qui se retrouvent en aval de *shh*, soit *nodal* et *pitx-2*, dans la lame latérale droite (Levin *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1998). Curieusement, les embryons de caille DVA montrent une expression asymétrique normale de *shh*, ce qui suggère que l'AR endogène régule l'expression de *lefty* et *nodal* en agissant en aval de *shh* ou dans une cascade parallèle (Chen *et al.*, 1996). Chez l'embryon de souris, il est difficile d'inclure *shh* dans le tableau, étant donné que les événements en amont de *lefty/nodal* sont encore inconnus. Un excès d'AR n'affecte pas l'expression de *shh* autour du noeud de la souris qui est d'ailleurs symétrique en temps normal (Chazaud *et al.*, 1999, nos résultats non-publiés). Enfin, aucun défaut de latéralité n'a encore été décrit chez les mutants *shh*<sup>-</sup> (Chiang *et al.*, 1996).

D'autres expériences suggèrent que les rétinoïdes endogènes ne sont requis ni pour l'induction ni pour le maintien de l'expression asymétrique de *nodal* autour du noeud. Notamment, le traitement d'embryons de souris *in vitro* avec l'antagoniste des RAR abolit l'expression de *nodal* dans la lame latérale, mais pas autour du noeud (Chazaud *et al.*, 1999). La perturbation de l'expression de *nodal*

autour du noeud que nous observons suivant le traitement avec un excès d'AR pourrait donc constituer un effet pharmacologique, et non physiologique, de l'AR. Néanmoins, elle pourrait toujours causer les défauts cardiaques observés.

Personne n'a jamais rapporté une asymétrie gauche-droite dans la distribution de l'AR ou de toute autre composante de la voie des rétinoïdes au cours de l'embryogenèse de la souris. Comment donc l'AR contrôlerait-il l'expression asymétrique des gènes? Le moyen le plus plausible impliquerait une collaboration avec un facteur distribué asymétriquement où l'AR jouerait un rôle permissif. L'identité de ce facteur est difficile à cerner. Comme discuté plus haut, l'action de l'AR dans la cascade gauche-droite semble se situer entre *shh* et *lefty-2/nodal*. Toutefois, les événements en aval de *shh*, requis pour l'induction de *nodal* dans le mésoderme latéral, sont encore inconnus. L'identification des facteurs agissant sur le promoteur de *lefty-2* et *nodal* (facteur X hypothétique) compléterait la cascade et permettrait de découvrir des partenaires pouvant agir conjointement avec l'AR.

### **3 LE MÉSODERME NAISSANT: UNE CIBLE POTENTIELLE DE L'AR**

L'expression bilatérale postérieure des quatre gènes étudiés, détectée suivant le traitement, est limitée à la partie postérieure de l'embryon ce qui suggère que l'effet d'un excès d'AR pourrait se situer au niveau du mésoderme naissant. Voici les arguments qui supportent notre point de vue. Premièrement, l'expression ectopique (droite) des gènes observée après le traitement est restreinte au mésoderme latéral postérieur et elle s'étend plus ou moins antérieurement, selon le temps d'exposition à l'AR. Ainsi, l'étendue du domaine d'expression ectopique droit reflète la distance parcourue par les cellules de mésoderme émergeant de la ligne primitive au début du traitement. De plus, la diminution marquée de l'expression de *brachyury*, un marqueur du mésoderme postérieur de l'embryon, observée suivant le traitement, suggère une perturbation

justement au niveau de ce tissu. Deuxièmement, au stade 7,75 jpc, l'expression des gènes impliqués dans la latéralité est absente de la ligne primitive et elle apparaît seulement dans le mésoderme latéral. L'extension du domaine d'expression normal (gauche) jusqu'à l'allantoïde suivant le traitement suggère que l'excès d'AR reprogramme le mésoderme naissant qui commence à exprimer les quatre gènes au moment où il quitte la ligne primitive. Le mécanisme exact de cet événement est malheureusement difficile à anticiper. Normalement, les gènes *lefty* sont exprimés symétriquement dans la ligne primitive et dans le mésoderme de l'embryon durant la gastrulation, soit du jour embryonnaire 7,0 à 7,5. Étant donné que *lefty-1* constitue une cible directe de l'AR, peut-être son expression est-elle réactivée par le traitement avec l'AR?

Le partenaire présumé de l'AR, nécessaire pour l'induction asymétrique des gènes, ne peut être sous l'influence de l'AR distribué symétriquement, car, en temps normal, son expression serait également symétrique. Une perturbation de la barrière médiane doit donc être évoquée afin d'expliquer une expression bilatérale en situation d'excès. La barrière médiane implique le noeud, la notochorde et le plancher du tube neural. L'expression renforcée des marqueurs *shh* et *HNF-3 $\beta$* , l'expression normale de *lefty-1* ainsi que l'analyse histologique indiquent que, même après le traitement, les structures médianes constituent une barrière physiquement et fonctionnellement intacte. L'expression bilatérale observée dans le cas de tous les gènes étudiés ne peut donc être expliquée par l'abolition de la barrière médiane 'classique'. Puisque l'expression ectopique droite s'étend rarement antérieurement par rapport au noeud, on pourrait suggérer l'existence d'une barrière postérieure correspondant à la ligne primitive. L'expression bilatérale postérieure serait donc une conséquence de la perte de cette barrière hypothétique suivant le traitement avec l'AR.

Le mécanisme proposé ci-dessus est très spéculatif et il est difficile à dire dans quelle mesure il reflète les fonctions physiologiques de l'AR. Des expériences additionnelles sont nécessaires afin de déterminer l'importance de

l'AR dans l'établissement de l'axe gauche-droite chez l'embryon. Une des approches implique le blocage de la voie des rétinoïdes d'un côté de l'embryon seulement. Les gènes *lefty-2* et *nodal* sont les premiers gènes connus exprimés asymétriquement chez la souris. En exprimant P450RAI, l'enzyme impliquée dans la dégradation de l'AR, sous le contrôle de l'élément 'enhancer' asymétrique de *lefty* dans les souris transgéniques, on pourrait éliminer la signalisation de l'AR dans les cellules de la lame latérale gauche, à partir du stade de 3-4 somites. Alternativement, de la même façon, on pourrait cibler dans le même domaine d'expression un dominant négatif des RAR. Ainsi, en bloquant la voie des rétinoïdes, on déterminerait si l'AR endogène est nécessaire pour l'induction ou le maintien de l'expression des gènes exprimés dans le mésoderme latéral gauche.

#### **4 CONCLUSION**

Plusieurs ont étudié l'effet tératogène de l'AR sur la cardiogenèse du point de vue morphologique et cellulaire. Peu d'entre eux se sont attardés sur les causes moléculaires des malformations observées. Un des phénotypes intéressants causé par un excès d'AR est la perturbation de la latéralité cardiaque. La découverte récente de plusieurs gènes impliqués dans l'établissement de l'axe gauche-droite nous a permis d'étudier la relation potentielle entre l'AR et la latéralité. En somme, nous avons découvert que l'AR, vraisemblablement à travers un effet sur le mésoderme naissant, perturbe l'expression des gènes impliqués dans l'établissement de l'axe gauche-droite chez la souris. Notre étude, ainsi que celle de Chazaud *et al.* (1999), sont les premières à établir un lien moléculaire entre l'AR et le développement de l'axe gauche-droite. Plus précisément, nous démontrons l'implication de l'AR dans une étape précoce de l'établissement de la latéralité, soit l'induction de l'expression asymétrique des gènes dans la lame latérale gauche de l'embryon. Toutefois, le rôle exact de l'AR reste encore à déterminer.

Finalement, nos résultats suggèrent que des mutations dans différentes composantes de la voie des rétinoïdes peuvent constituer une cause génétique des perturbations de latéralité chez les humains. Des malformations cardiaques sont très fréquentes chez des nouveau-nés et certaines d'entre elles incluent des défauts du *situs*. La déficience diététique en vitamine A pourrait donc constituer un facteur environnemental important augmentant la fréquence de ces malformations.

## BIBLIOGRAPHIE

Abu-Abed, S.S., Beckett, B.R., Chiba, H., Chithalen, J.V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P. et Petkovich, M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 2409-2415.

Adachi, H., Saijoh, Y., Mochida, K., Ohishi, S., Hashiguchi, H., Hirao, A. et Hamada, H. (1999). Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 promoter. *Genes and Dev.* **13**, 1598-1600.

Afzelius, B.A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* **193**, 317-319.

Afzelius, B.A. (1985). The immotile-cilia syndrome: a microtubule-associated defect. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 63-87.

Agarwal, V.R. et Sato, S.M. (1993). Retinoic acid affects central nervous system development of *Xenopus* by changing cell fate. *Mech. Develop.* **44**, 167-173.

Alles, A.J. et Sulik, K.K. (1990). Retinoic acid-induced spina bifida: evidence for a pathogenetic mechanism. *Development* **108**, 73-81.

Ang, H.L., Deltour, L., Hayamizu, T.F., Zgombic-Knight, M. et Duester, G. (1996). Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 9526-9534.

Ang, H.L. et Duester, G. (1997). Initiation of retinoid signaling in primitive streak mouse embryos: spatiotemporal expression patterns of receptors and metabolic enzymes for ligand synthesis. *Dev. Dynam.* **208**, 536-543.

Ang, S.L. et Rossant, J. (1994). HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* **78**, 561-574.

Bannister, A.J. et Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643.

Beddington, R.S. (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development* **120**, 613-620.

Beddington, R.S. et Robertson, E.J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* **96**, 195-209.

- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y. et Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes and Dev.* **12**, 1638-1651.
- Blomhoff, R. (1994). *Vitamin A in health and disease*. Marcel Dekker N. Y.,
- Boylan, J.F., Lufkin, T., Achkar, C.C., Taneja, R., Chambon, P. et Gudas, L.J. (1995). Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 843-851.
- Brown, N.A., McCarthy, A. et Wolpert, L. (1991). Development of handed body asymmetry in mammals. *Ciba F. Symp.* **162**, 182-196.
- Brown, N.A. et Wolpert, L. (1990). The development of handedness in left/right asymmetry. *Development* **109**, 1-9.
- Campione, M., Steinbeisser, H., Schweickert, A., Deissler, K., van Bebber, F., Lowe, L.A., Nowotschin, S., Viebahn, C., Haffter, P., Kuehn, M.R. et Blum, M. (1999). The homeobox gene Pitx2: mediator of asymmetric left-right signaling in vertebrate heart and gut looping. *Development* **126**, 1225-1234.
- Casey, B. (1998). Two rights make a wrong: human left-right malformations. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1565-1571.
- Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M. et Evans, R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99-103.
- Chambon, P. (1994). The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin. Cell Biol.* **5**, 115-125.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940-954.
- Chazaud, C., Chambon, P. et Dollé, P. (1999). Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development* **126**, 2589-2596.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. et Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569-580.
- Chen, J.D. et Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.

- Chen, Y., Dong, D., Kostetskii, I. et Zile, M.H. (1996). Hensen's node from vitamin A-deficient quail embryo induces chick limb bud duplication and retains its normal asymmetric expression of Sonic hedgehog (Shh). *Dev. Biol.* **173**, 256-264.
- Chen, Y. et Solursh, M. (1992). Comparison of Hensen's node and retinoic acid in secondary axis induction in the early chick embryo. *Dev. Dynam.* **195**, 142-151.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H. et Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog. *Nature* **383**, 407-413.
- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., Gage, F.H., Stevens, C.F. et Evans, R.M. (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron* **21**, 1353-1361.
- Chiba, H., Clifford, J., Metzger, D. et Chambon, P. (1997). Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3013-3020.
- Ciana, P., Braliou, G.G., Demay, F.G., von Lindern, M., Baretino, D., Beug, H. et Stunnenberg, H.G. (1998). Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer in vivo. *EMBO J.* **17**, 7382-7394.
- Clagett-Dame, M. et Plum, L.A. (1997). Retinoid-regulated gene expression in neural development. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **7**, 299-342.
- Collignon, J., Varlet, I. et Robertson, E.J. (1996). Relationship between asymmetric nodal expression and the direction of embryonic turning. *Nature* **381**, 155-158.
- Collins, M.D. et Mao, G.E. (1999). Teratology of retinoids. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 399-430.
- Creech, K.J., Lofberg, B., Chahoud, I., Bochert, G. et Nau, H. (1989). Teratogenicity and placental transfer of all-trans-, 13-cis-, 4-oxo-all-trans-, and 4-oxo-13-cis-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* **100**, 162-176.
- Danos, M.C. et Yost, H.J. (1996). Role of notochord in specification of cardiac left-right orientation in zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Biol.* **177**, 96-103.
- De Luca, L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* **5**, 2924-2933.

Dersch, H. et Zile, M.H. (1993). Induction of normal cardiovascular development in the vitamin A-deprived quail embryo by natural retinoids. *Dev. Biol.* **160**, 424-433.

Dickman, E.D. et Smith, S.M. (1996). Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev. Dynam.* **206**, 39-48.

Dollé, P., Fraulob, V., Kastner, P. et Chambon, P. (1994). Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech. Develop.* **45**, 91-104.

Dollé, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G. et Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**, 1133-1151.

Duester, G. (1996). Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* **35**, 12221-12227.

Dyson, E., Sucov, H.M., Kubalak, S.W., Schmid-Schonbein, G.W., DeLano, F.A., Evans, R.M., Ross, J.J. et Chien, K.R. (1995). Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha  $-/-$  mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7386-7390.

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.

Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I. et Yisraeli, J.K. (1995). Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **14**, 5109-5114.

Forman, B.M., Umesono, K., Chen, J. et Evans, R.M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541-550.

Freedman, L.P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* **97**, 5-8.

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

Gebbia, M., Ferrero, G.B., Pilia, G., Bassi, M.T., Aylsworth, A., Penman-Splitt, M., Bird, L.M., Bamforth, J.S., Burn, J., Schlessinger, D., Nelson, D.L. et Casey, B.

(1997). X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nature Genet.* **17**, 305-308.

Geelen, J.A. (1979). Hypervitaminosis A induced teratogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **6**, 351-375.

Ghyselinck, N.B., Dupe, V., Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J.M., Rochette-Egly, C., Chambon, P. et Mark, M. (1997). Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* **41**, 425-447.

Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Messaddeq, N., Dierich, A., Lampron, C., Decimo, D., Viville, S., Chambon, P. et Mark, M. (1998). Contribution of retinoic acid receptor beta isoforms to the formation of the conotruncal septum of the embryonic heart. *Dev. Biol.* **198**, 303-318.

Gudas, L.J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.* **269**, 15399-15402.

Harvey, R.P. (1998). Links in the left/right axial pathway. *Cell* **94**, 273-276.

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

Hendrickx, A.G., Silverman, S., Pellegrini, M. et Steffek, A.J. (1980). Teratological and radiocephalometric analysis of craniofacial malformations induced with retinoic acid in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Teratology* **22**, 13-22.

Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J. et Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* **375**, 787-790.

Heymer, J., Kuehn, M. et Ruther, U. (1997). The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant Ft suggests a function in the establishment of handedness. *Mech. Develop.* **66**, 5-11.

Holzbaur, E.L. et Vallee, R.B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 339-372.

Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J. et Stallcup, M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2735-2744.

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

Horton, C. et Maden, M. (1995). Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Dev. Dynam.* **202**, 312-323.

Hutter, H. et Schnabel, R. (1994). *glp-1* and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*. *Development* **120**, 2051-2064.

Hyatt, B.A. et Yost, H.J. (1998). The left-right coordinator: the role of *Vg1* in organizing left-right axis formation. *Cell* **93**, 37-46.

Irie, K., Ando, M. et Takao, A. (1990). *Embryonic origins of defective heart development*. N.Y. Acad. Sci. N.Y., pp. 387-388.

Isaac, A., Sargent, M.G. et Cooke, J. (1997). Control of vertebrate left-right asymmetry by a snail-related zinc finger gene. *Science* **275**, 1301-1304.

Itasaki, N., Nakamura, H., Sumida, H. et Yasuda, M. (1991). Actin bundles on the right side in the caudal part of the heart tube play a role in dextro-looping in the embryonic chick heart. *Anat. Embryol.* **183**, 29-39.

Iulianella, A., Beckett, B., Petkovich, M. et Lohnes, D. (1999). A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev. Biol.* **205**, 33-48.

Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* **92**, 307-313.

Kadosh, D. et Struhl, K. (1998). Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5121-5127.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414.

Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.L., Dollé, P. et Chambon, P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987-1003.

Kastner, P., Mark, M. et Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859-869.

Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M. et Chambon, P. (1997b). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* **124**, 313-326.

- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J.M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A. et Chambon, P. (1996a). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes and Dev.* **10**, 80-92.
- Kastner, P., Messaddeq, N., Mark, M., Wendling, O., Grondona, J.M., Ward, S., Ghyselinck, N. et Chambon, P. (1997). Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development* **124**, 4749-4758.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, TP., Taira, K., Chiu, R., Livingston, DM. et Yokoyama, KK. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* **393**, 284-289.
- Kessel, M. et Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.
- Kispert, A., Ortner, H., Cooke, J. et Herrmann, B.G. (1995). The chick Brachyury gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. *Dev. Biol.* **168**, 406-415.
- Kitabayashi, I., Chiu, R., Umesono, K., Evans, R.M., Gachelin, G. et Yokoyama, K. (1994). A novel pathway for retinoic acid-induced differentiation of F9 cells that is distinct from receptor-mediated trans-activation. *In Vitro Cellular et Developmental Biology. Animal.* **30A**, 761-768.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* **279**, 703-707.
- Kostetskii, I., Yuan, S.Y., Kostetskaia, E., Linask, K.K., Blanchet, S., Seleiro, E., Michaille, J.J., Brickell, P. et Zile, M. (1998). Initial retinoid requirement for early avian development coincides with retinoid receptor coexpression in the precardiac fields and induction of normal cardiovascular development. *Dev. Dynam.* **213**, 188-198.
- Kraus, W.L. et Kadonaga, J.T. (1998). p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes and Dev.* **12**, 331-342.
- Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P. et Chambon, P. (1996). RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9010-9014.
- Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupe, V., Kastner, P., Borrelli, E. et Chambon, P. (1998). Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* **279**, 863-867.

- Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A. et Glass, C.K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* **371**, 528-531.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G. et Glass, C.K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**, 451-454.
- Kurokawa, R., Yu, V.C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M.G. et Glass, C.K. (1993). Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes and Dev.* **7**, 1423-1435.
- Leber, B.F. et Denburg, J.A. (1997). Retinoic acid modulation of induced basophil differentiation. *Allergy* **52**, 1201-1206.
- Leblanc, B.P. et Stunnenberg, H.G. (1995). 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes and Dev.* **9**, 1811-1816.
- Lee, Y.M., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Moon, C.K., Eriksson, U. et Eto, K. (1995). Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. *Development* **121**, 825-837.
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M. et Mader, S. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* **68**, 377-395.
- Levin, M., Johnson, R.L., Stern, C.D., Kuehn, M. et Tabin, C. (1995). A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* **82**, 803-814.
- Levin, M. et Mercola, M. (1998). Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **203**, 90-105.
- Levin, M. et Mercola, M. (1998). The compulsion of chirality: toward an understanding of left-right asymmetry. *Genes and Dev.* **12**, 763-769.
- Levin, M., Pagan, S., Roberts, D.J., Cooke, J., Kuehn, M.R. et Tabin, C.J. (1997). Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev. Biol.* **189**, 57-67.
- Li, E., Sucov, H.M., Lee, K.F., Evans, R.M. et Jaenisch, R. (1993). Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the alpha 1 retinoic acid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1590-1594.

- Logan, M., Pagan-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.
- Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M. et Chambon, P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643-658.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. et Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723-48.
- Lohr, J.L., Danos, M.C., Groth, T.W. et Yost, H.J. (1998). Maintenance of asymmetric nodal expression in *Xenopus laevis*. *Dev. Genet.* **23**, 194-202.
- Lohr, J.L., Danos, M.C. et Yost, H.J. (1997). Left-right asymmetry of a nodal-related gene is regulated by dorsoanterior midline structures during *Xenopus* development. *Development* **124**, 1465-1472.
- Lowe, L.A., Supp, D.M., Sampath, K., Yokoyama, T., Wright, C.V., Potter, S.S., Overbeek, P. et Kuehn, M.R. (1996). Conserved left-right asymmetry of nodal expression and alterations in murine situs inversus. *Nature* **381**, 158-161.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M. et Chambon, P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7225-7229.
- Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R.A., Rossant, J. et Giguere, V. (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech. Develop.* **53**, 61-71.
- Maden, M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T. et Gale, E. (1998). The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development* **125**, 4133-4144.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y. et Chambon, P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 591-600.
- Mangelsdorf, D.J. et Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R. et Goldstein, L.S.B. (1999). Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5043-5048.

- Matzuk, M.M., Kumar, T.R. et Bradley, A. (1995b). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* **374**, 356-360.
- Matzuk, M.M., Kumar, T.R., Vassalli, A., Bickenbach, J.R., Roop, D.R., Jaenisch, R. et Bradley, A. (1995a). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* **374**, 354-356.
- Means, A.L. et Gudas, L.J. (1995). The roles of retinoids in vertebrate development. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 201-233.
- Melloy, P.G., Ewart, J.L., Cohen, M.F., Desmond, M.E., Kuehn, M.R. et Lo, C.W. (1998). No turning, a mouse mutation causing left-right and axial patterning defects. *Dev. Biol.* **193**, 77-89.
- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P. et Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**, 2749-2771.
- Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S. et Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes to Cells* **2**, 513-524.
- Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y. et Hamada, H. (1996). Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member *lefty* in mouse embryos. *Nature* **381**, 151-155.
- Meno, C., Shimono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. et Hamada, H. (1998). *lefty-1* is required for left-right determination as a regulator of *lefty-2* and *nodal*. *Cell* **94**, 287-297.
- Miller, S.A. et Runner, M.N. (1978). Tissue specificity for incorporation of [<sup>3</sup>H]thymidine by the 10- to 12-somite mouse embryo: alteration by acute exposure to hydroxyurea. *Journal of Embryology et Experimental Morphology* **44**, 181-189.
- Miller, S.A. et White, R.D. (1998). Right-left asymmetry of cell proliferation predominates in mouse embryos undergoing clockwise axial rotation. *Anat. Rec.* **250**, 103-108.
- Miura, S., Miyagawa, S., Morishima, M., Ando, M. et Takao, A. (1990). Retinoic acid-induced viscerotrial heterotaxy syndrome in rat embryos. In *Developmental cardiology:morphogenesis and function* (Clark, D.B. and Takao, A., eds.), Futura, Mount Kisco, N.Y., pp. 467-484.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K. et Mikoshiba, K. (1997). The expression of the mouse *Zic1*, *Zic2*, and *Zic3* gene

suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev. Biol.* **182**, 299-313.

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1993) RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* **12**, 2349-60.

Nagpal, S., Cai, J., Zheng, T., Patel, S., Masood, R., Lin, G.Y., Friant, S., Johnson, A., Smith, D.L., Chandraratna, R.A. et Gill, P.S. (1997). Retinoid antagonism of NF-IL6: insight into the mechanism of antiproliferative effects of retinoids in Kaposi's sarcoma. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4159-4168.

Napoli, J.L. (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunop.* **80**, t-62

Nascone, N. et Mercola, M. (1997). Organizer induction determines left-right asymmetry in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **189**, 68-78.

Nelsen, E.M., Frankel, J. et Jenkins, L.M. (1989). Non-genic inheritance of cellular handedness. *Development* **105**, 447-456.

Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., Chambon, P. et Dollé, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Develop.* **62**, 67-78.

Niederreither, K., Subbarayan, V., Dollé, P. et Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genet.* **21**, 444-448.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. et Hirokawa, N. (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**, 829-837.

Norris, D.P. et Robertson, E.J. (1999). Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes and Dev.* **13**, 1575-1588.

Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J. et Nakatani, Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**, 35-44.

Oh, S.P. et Li, E. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes and Dev.* **11**, 1812-1826.

Oonate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-1357.

Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Mattei, M.G., Dollé, P. et Chambon, P. (1998). *Stra3/lefty*, a retinoic acid-inducible novel member of the transforming growth factor-beta superfamily. *Int. J. Dev. Biol.* **42**, 23-32.

Pagan-Westphal, S.M. et Tabin, C.J. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell* **93**, 25-35.

Payne, R.M., Johnson, M.C., Grant, J.W. et Strauss, A.W. (1995). Toward a molecular understanding of congenital heart disease. *Circulation* **91**, 494-504.

Pearce, J.J.H., Penny, G. et Rossant, J. (1999). A mouse *cerberus/Dan*-related gene family. *Dev. Biol.* **209**, 98-110.

Perlmann, T. et Evans, R.M. (1997). Nuclear receptors in Sicily: all in the famiglia. *Cell* **90**, 391-397.

Pijnappel, W.W., Hendriks, H.F., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., Dekker, E.J., Edelenbosch, C., van der Saag, P.T. et Durston, A.J. (1993). The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* **366**, 340-344.

Ramsdell, A.F. et Yost, H.J. (1998). Molecular mechanisms of vertebrate left-right development. *Trends Genet.* **14**, 459-465.

Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P. et Schutz, G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-541.

Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M. et Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97-107.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M. et Giguere, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes and Dev.* **5**, 1333-1344.

Ruberte, E., Dollé, P., Chambon, P. et Morriss-Kay, G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* **111**, 45-60.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Suka, N., Turner, B.M. et Grunstein, M. (1998). Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* **392**, 831-835.

Ryan, A.K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S., Norris, D.P., Robertson, E.J., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. et Izpisua, B.J. (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* **394**, 545-551.

Saijoh, Y., Adachi, H., Mochida, K., Ohishi, S., Hirao, A. et Hamada, H. (1999). Distinct transcriptional regulatory mechanisms underlie left-right asymmetric expression of lefty-1 and lefty-2. *Genes and Dev.* **13**, 259-269.

Samad, T.A., Krezel, W., Chambon, P. et Borrelli, E. (1997). Regulation of dopaminergic pathways by retinoids: activation of the D2 receptor promoter by members of the retinoic acid receptor-retinoid X receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14349-14354.

Sasaki, H. et Hogan, B.L. (1994). HNF-3 beta as a regulator of floor plate development. *Cell* **76**, 103-115.

Schauerte, H.E., van Eeden, F.J., Fricke, C., Odenthal, J., Strahle, U. et Haffter, P. (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* **125**, 2983-2993.

Sefton, M., Sanchez, S. et Nieto, M.A. (1998). Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* **125**, 3111-3121.

Shenefelt, R.E. (1972). Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology* **5**, 103-118.

Smith, S.M., Dickman, E.D., Thompson, R.P., Sinning, A.R., Wunsch, A.M. et Markwald, R.R. (1997). Retinoic acid directs cardiac laterality and the expression of early markers of precardiac asymmetry. *Dev. Biol.* **182**, 162-171.

Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194-198.

Sporn, M.B., Roberts, A.B. et Goodman, D.S. (1994). *The retinoids: biology, chemistry and Medicine*. Raven Press Ltd. N.Y.,

Stalsberg, H. (1969). The origin of heart asymmetry: right and left contributions to the early chick embryo heart. *Dev. Biol.* **19**, 109-127.

Subbarayan, V., Kastner, P., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P. et Chambon, P. (1997). Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR gamma 1 and RAR gamma 2 isoforms. *Mech. Develop.* **66**, 131-142.

Sucov, H.M., Dyson, E., Gumeringer, C.L., Price, J., Chien, K.R. et Evans, R.M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes and Dev.* **8**, 1007-1018.

Sulik, K., Dehart, D.B., Langaki, T., Carson, J.L., Vrablic, T., Gesteland, K. et Schoenwolf, G.C. (1994). Morphogenesis of the murine node and notochordal plate. *Dev. Dynam.* **201**, 260-278.

Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S. et Brueckner, M. (1997). Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. *Nature* **389**, 963-966.

Takada, T., Kinkori, T., Muramatsu, H., Hayakawa, A., Torii, S. et Muramatsu, T. (1997). Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine, is a novel regulator of intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **241**, 756-761.

Taneja, R., Bouillet, P., Boylan, J.F., Gaub, M.P., Roy, B., Gudas, L.J. et Chambon, P. (1995). Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7854-7858.

Teilmann, K. (1989). Retinoids: toxicology and teratogenicity to date. *Pharmacol. Therapeut.* **40**, 29-43.

Thaller, C. et Eichele, G. (1990). Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. *Nature* **345**, 815-819.

Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**, 677-684.

Tsuda, T., Philp, N., Zile, M.H. et Linask, K.K. (1996). Left-right asymmetric localization of flectin in the extracellular matrix during heart looping. *Dev. Biol.* **173**, 39-50.

Twal, W., Roze, L. et Zile, M.H. (1995). Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo. *Dev. Biol.* **168**, 225-234.

Vaisberg, E.A., Grissom, P.M. et McIntosh, J.R. (1996). Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J. Cell Biol.* **133**, 831-842.

- van den Biggelaar, J.A. (1991). Asymmetries during molluscan embryogenesis. *Ciba F. Symp.* **162**, 128-137.
- Van Maldergem, L., Jauniaux, E. et Gillerot, Y. (1992). Morphological features of a case of retinoic acid embryopathy. *Prenatal Diag.* **12**, 699-701.
- Vivanco, R.M., Bugge, T.H., Hirschmann, P. et Stunnenberg, H.G. (1991). Functional characterization of a natural retinoic acid responsive element. *EMBO J.* **10**, 3829-3838.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. et Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* **17**, 507-519.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S. et Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* **343**, 657-659.
- Wilson J.G., Roth, C.B. et Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* **92**, 189-217.
- Wood, W.B. (1991). Evidence from reversal of handedness in *C. elegans* embryos for early cell interactions determining cell fates. *Nature* **349**, 536-538.
- Wood, W.B. (1997). Left-right asymmetry in animal development. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 53-82.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* **279**, 1922-1925.
- Xu, L., Glass, C.K. et Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 140-147.
- Yao, T.P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. et Livingston, D.M. (1996a). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10626-10631.
- Yao, T.P., Oh, S.P., Fuchs, M., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M. et Eckner, R. (1998b). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**, 361-372.
- Yasui, H., Morishima, M., Nakazawa, M. et Aikawa, E. (1998). Anomalous looping, atrioventricular cushion dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryos with right isomerism induced by retinoic acid. *Anat. Rec.* **250**, 210-219.

- Yasui, H., Nakazawa, M., Morishima, M., Ando, M., Takao, A. et Aikawa, E. (1997). Cardiac outflow tract septation process in the mouse model of transposition of the great arteries. *Teratology* **55**, 353-363.
- Yasui, H., Nakazawa, M., Morishima, M., Miyagawa-Tomita, S. et Momma, K. (1995). Morphological observations on the pathogenetic process of transposition of the great arteries induced by retinoic acid in mice. *Circulation* **91**, 2478-2486.
- 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.
- Yost, H.J. (1990). Inhibition of proteoglycan synthesis eliminates left-right asymmetry in *Xenopus laevis* cardiac looping. *Development* **110**, 865-874.
- Yost, H.J. (1991). *Biological asymmetry and handedness*. Wiley Chinchester, England, pp. 165-181.
- Yost, H.J. (1992). Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix. *Nature* **357**, 158-161.
- Zechel, C., Shen, X.Q., Chambon, P. et Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* **13**, 1414-1424.
- Zechel, C., Shen, X.Q., Chen, J.Y., Chen, Z.P., Chambon, P. et Gronemeyer, H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* **13**, 1425-1433.
- Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K.J., Neve, R.L., Hogan, P., Chin, W.W. et Drager, U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Bioch.* **240**, 15-22.
- Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B.L. et Kuehn, M.R. (1993). Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr. David Lohnes, pour m'avoir introduit au monde de la biologie du développement ainsi que pour l'encadrement qu'il m'a procuré au cours des deux dernières années.

De plus, je tiens à remercier les membres du laboratoire, tout particulièrement Debbie Allan et Martin Houle, pour avoir supporté mes moments de découragement et de déprime ainsi que mon entêtement et ... mes fautes d'anglais!

Finalement, mille remerciements à mes parents pour m'avoir inculqué cette ambition qui me pousse toujours à aller un peu plus loin, et à Patrick Champagne, pour m'avoir montré qu'il y a des choses bien plus importantes dans la vie que les quatre murs d'une bibliothèque.