

Université de Montréal

Les facteurs à homéodomaine Pitx et Irx lors du
développement des membres postérieurs

Par

Marisol Lavertu Jolin

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en biologie moléculaire

Juillet, 2009

© Marisol Lavertu Jolin, 2009

Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Les facteurs à homéodomaine Pitx et Irx lors du
développement des membres postérieurs

Présenté par :

Marisol Lavertu Jolin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marie Kmita
Président rapporteur

Jacques Drouin
Directeur de recherche

Stéphane Roy
Membre du jury

Mémoire accepté : juillet 2009

Résumé

Les facteurs de transcription *Pitx* ont été impliqués dans la croissance et la détermination de l'identité des membres postérieurs. D'abord, l'inactivation de *Pitx1* chez la souris résulte en la transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs. Ensuite, la double mutation de *Pitx1* et de *Pitx2* a montré l'activité redondante de ces facteurs pour la croissance des membres postérieurs. Ainsi, les souris mutantes *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} montrent une perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs. Des travaux récents ont impliqué les gènes de la famille des *Iroquois* dans le développement des membres. Tout particulièrement, les souris *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} montrent la perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs, exclusivement au niveau des membres postérieurs. Cette phénocopie entre les souris mutantes pour *Pitx1/2* et *Irx3/5* nous a amenés à poser trois hypothèses : (1) les *Pitx* sont responsables de l'expression de *Irx* dans les bourgeons postérieurs ; (2) à l'inverse, les *Irx* dirigent l'expression des *Pitx* ; (3) les *Pitx* et les *Irx* participent ensemble au programme génétique de croissance des bourgeons postérieurs. Nous avons pu conclure que les *Pitx* et les *Irx* font partie de cascades de régulation indépendantes l'une de l'autre et qu'ils sont capables d'interaction transcriptionnelle autant sur un promoteur générique que sur des régions conservées du locus de *Tbx4*. Enfin, autant l'inactivation *Pitx* que celle des *Irx* mène à un retard d'expression de *Pax9* exclusivement dans les bourgeons postérieurs. Ainsi, les *Pitx* et les *Irx* semblent agir sur des programmes génétiques parallèles impliqués dans la croissance et le patterning des membres postérieurs.

Mots-clefs : croissance des membres, spécification des membres, patterning, régulation génique, transcription, interactions génétiques, développement du squelette

Abstract

The *Pitx* transcription factors have been implicated in growth and specification of hindlimb identity. First, *Pitx1* gene inactivation in mice results in partial transformation of hindlimbs into forelimbs. Further, *Pitx1* and *Pitx2* have redundant activity for hindlimb growth as demonstrated in double mutant mice for *Pitx1* and *Pitx2*. Indeed, *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{neo/neo} mice show loss of proximal (femur) and anterior (ilium, tibia and first digit) skeletal structures. A collaborator, Dr C. C. Hui of Toronto University, has demonstrated the importance of the *Iroquois* (*Irx*) family transcription factors in hindlimb development. *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} mice show loss of proximal and anterior skeletal structures, exclusively in hindlimbs, even if *Irx* are expressed in the two limb pairs. This phenocopy between *Pitx* and *Irx* mutants led us to investigate the interaction between these transcription factors with three hypotheses : (1) *Pitx* control *Irx* expression in hindlimb buds ; (2) the *Irx* direct *Pitx* gene expression in hindlimb bud ; (3) *Pitx* and *Irx* participate together in a growth regulation cascade in hindlimb buds. Our analyses led us to conclude that *Pitx* and *Irx* are in independant genetic cascade in hindlimb buds. However, we observed that *Pitx* and *Irx* transcription factors are capable of transcriptional interactions assessed using either a generic promoter or conserved regions of the *Tbx4* locus. Finally, inactivation of either *Pitx* or *Irx* led to a delay of *Pax9* expression exclusively in hindlimb buds. In sum, *Pitx* and *Irx* gene appear to act on parallel genetic programs involved in control of hindlimbs growth and patterning.

Key words : limb growth, limb identity, patterning, gene regulation, transcription, genetic interactions, skeletal development

Table des matières

Titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv

Chapitre 1. Introduction

1.1 Le développement des membres : considérations d'ordre général.....	2
1.2 Le développement des membres selon trois axes.....	3
1.2.1 L'AER et l'axe proximo-distal.....	4
1.2.1.1 Les expériences d'embryologie classique.....	4
1.2.1.2 L'induction de la croissance du bourgeon.....	6
1.2.1.3 Activité moléculaire de l'AER.....	9
1.2.1.4 Les mutants pour les <i>Fgfs</i>	11
1.2.1.5 L'AER et le patterning selon l'axe proximo-distal : 3 modèles...	14
1.2.2 La ZPA et l'axe antéropostérieur.....	18
1.2.2.1 Activité moléculaire de la ZPA : Shh.....	18
1.2.2.2 Positionnement de la ZPA.....	19
1.2.2.3 La signalisation par Shh.....	20

1.2.2.4 Le patterning selon l'axe antéropostérieur.....	22
1.2.2.5 Interactions entre Shh de la ZPA et les Fgfs de l'AER.....	23
1.2.3 L'ectoderme et l'axe dorso-ventral.....	24
1.3 La spécification de l'identité des membres.....	26
1.3.1 La famille des gènes <i>Pitx</i>	26
1.3.1.1 Propriétés générales des facteurs de transcription <i>Pitx</i>	26
1.3.1.2 <i>Pitx1</i>	28
1.3.1.3 <i>Pitx2</i>	31
1.3.1.4 <i>Pitx3</i>	37
1.3.1.5 <i>Pitx1</i> et l'identité des membres postérieurs.....	39
1.3.1.6 Activité redondante de <i>Pitx1</i> et <i>Pitx2</i> dans le développement des membres postérieurs.....	42
1.3.2 La famille des gènes <i>Tbx</i>	45
1.3.2.1 Rôles de <i>Tbx4</i> et <i>Tbx5</i> dans la croissance des membres.....	46
1.3.2.1.1 <i>Tbx5</i> et la croissance des membres antérieurs.....	46
1.3.2.1.2 <i>Tbx4</i> et la croissance des membres postérieurs.....	47
1.3.2.2 Rôles de <i>Tbx4</i> et <i>Tbx5</i> dans l'identité des membres.....	50
1.3.2.2.1 <i>Tbx5</i> et l'identité des membres antérieurs.....	50
1.3.2.2.2 <i>Tbx4</i> et l'identité des membres postérieurs.....	51
1.4 La famille des gènes <i>Iroquois</i>	52
1.4.1 Cluster <i>IrxA</i>	55
1.4.2 Cluster <i>IrxB</i>	56
1.4.3 <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> dans le développement des membres.....	58
1.5 <i>Pax1</i> et <i>Pax9</i> dans le développement des membres.....	62

1.5.1 Régulation de l'expression de <i>Pax1</i> et <i>Pax9</i> dans le bourgeon de membre.....	65
1.6 Hypothèses de travail.....	67
 Chapitre 2. Matériels et Méthodes	
2.1 Souris.....	70
2.2 Hybridation <i>in situ</i> sur embryons entiers.....	70
2.3 Culture cellulaire et transfections.....	71
 Chapitre 3. Résultats	
3.1 Les patrons d'expression de <i>Pitx1</i> , <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> se chevauchent dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur.....	75
3.2 Étude de la hiérarchie transcriptionnelle entre les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i> lors du développement du bourgeon de membre postérieur.....	77
3.2.1 Maintien de l'expression de <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> chez les embryons mutants pour <i>Pitx1</i> et les mutants pour <i>Pitx1</i> et <i>Pitx2</i>	78
3.3 Étude de l'interaction fonctionnelle entre les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i>	81
3.3.1 Étude de l'interaction transcriptionnelle entre <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/5</i>	81
3.3.1.1 Essais transcriptionnels avec une protéine de fusion entre le domaine activateur de <i>Pitx1</i> et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et <i>Irx3/Irx5</i> sur un promoteur générique (5XUAS).....	82
3.3.1.2 Essais transcriptionnels avec <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/Irx5</i> sur des régions conservées du locus de <i>Tbx4</i>	85
3.3.2 Rôles convergents de <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/Irx5</i> : régulation de l'expression de <i>Pax9</i>	88
3.4 Conclusions.....	91

Chapitre 4. Discussion

4.1 Les patrons d'expression de <i>Pitx1</i> , <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> se chevauchent dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur.....	96
4.2 Étude de la hiérarchie transcriptionnelle entre les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i> lors du développement du bourgeon de membre postérieur.....	97
4.3 Étude de l'interaction fonctionnelle entre les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i>	98
4.3.1 Étude de l'interaction transcriptionnelle entre <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/5</i>	98
4.3.1.1 Essais transcriptionnels avec une protéine de fusion entre le domaine activateur de <i>Pitx1</i> et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et <i>Irx3/Irx5</i> sur un promoteur générique (5XUAS).....	98
4.3.1.2 Essais transcriptionnels avec <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/Irx5</i> sur les régions conservées du locus de <i>Tbx4</i>	100
4.3.2 Rôles convergents de <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/Irx5</i> : régulation de l'expression de <i>Pax9</i>	102
4.3.2.1 Régulation de l'expression des BMPs par les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i>	104
4.3.2.1.1 Première hypothèse : Régulation directe des BMPs par les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i>	107
4.3.2.1.2 Deuxième hypothèse : Régulation indirecte des BMPs par les <i>Pitx</i> et les <i>Irx</i>	107
Bibliographie	114

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Organisation génomique des gènes de la famille <i>Pitx</i>	27
Figure 1.2 Profil d'expression de <i>Pitx2</i> et phénotype des souris <i>Pitx2</i> ^{-/-}	34
Figure 1.3 Profil d'expression de <i>Pitx1</i> et phénotype des souris <i>Pitx1</i> ^{-/-}	40
Figure 1.4 Phénotype des souris <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{+/-} et <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{néo/néo}	44
Figure 1.5 Organisation génomique des gènes <i>Iroquois</i> et schématisation de la protéine Iro.....	54
Figure 1.6 Patron d'expression des gènes <i>Irx</i> lors du développement des membres.....	57
Figure 1.7 Implication de <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> dans le développement de l'omoplate, de la hanche et des membres postérieurs.....	60
Figure 1.8 Perte d'expression de <i>Pax1</i> et de <i>Pax9</i> au niveau des bourgeons de membres postérieurs des embryons <i>Irx3</i> ^{-/-} ; <i>Irx5</i> ^{-/-}	61

Chapitre 3. Résultats

Figure 3.1 Les patrons d'expression de <i>Pitx1</i> , <i>Pitx2</i> , <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> lors du développement des membres postérieurs à e10,5 et e11,5.....	76
Figure 3.2 Maintien de l'expression de <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> dans le bourgeon de membre postérieur des embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} et <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{néo/néo}	80
Figure 3.3 Essai d'interaction transcriptionnelle entre <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/5</i> à l'aide d'une protéine de fusion Gal4DBD_Cterm <i>Pitx1</i> et du promoteur générique 5X UAS.....	83
Figure 3.4 Essai d'interaction transcriptionnelle entre <i>Pitx1</i> et <i>Irx3/5</i> sur les régions conservées du locus de <i>Tbx4</i>	86
Figure 3.5 Retard et diminution de l'expression de <i>Pax9</i> dans le bourgeon de membre postérieur des embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} et <i>Pitx1</i> ^{-/-} ; <i>Pitx2</i> ^{néo/néo}	90

Chapitre 4. Discussion

Figure 4.1 Augmentation de l'expression de <i>Bmp7</i> dans le bourgeon de membre postérieur des embryons <i>Pitx1</i> ^{-/-} et modèle de travail.....	106
Figure 4.2 Maintien de l'expression de <i>Shh</i> et déplacement de la limite d'expression de <i>Gli1</i> chez les embryons <i>Irx3</i> ^{-/-} ; <i>Irx5</i> ^{-/-}	108
Figure 4.3 Perte d'expression de <i>Pax9</i> avec la perte d'allèles codant pour <i>Gli3</i> ...	112

Liste des sigles et abréviations

A/P	antéropostérieur
ac-sc	<i>achaete-scute</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AER	<i>apical ectodermal ridge</i>
ak	<i>aphakia</i>
All1	<i>myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1</i>
ara	<i>araucan</i>
Arp1	<i>All1 regulated protein 1</i>
Alx4	<i>aristaless-like homeobox protein 4</i>
ARN	acide ribonucléique
bHTH	<i>basic helix-turn-helix protein</i>
Bmp	<i>bone morphogenetic factor</i>
BmpR	<i>bone morphogenetic factor receptor</i>
caup	<i>caupolican</i>
Cre	<i>Cre recombinase enzyme</i>
D/V	dorso-ventral
dHand (Hand2)	<i>heart and neural crest derivative express 2</i>
Dlx2	<i>distal-less homeobox 2</i>
dpp	decapentaplegic
e	jour embryonnaire
ECM	<i>extra-cellular matrix</i>
En1	<i>Engrailed 1</i>

Erg-1	<i>Ets-related gene</i>
Fgf	<i>fibroblast growth factor</i>
FgfR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FSH	<i>follicule stimulating hormone</i>
Gdf5	<i>growth differentiating factor 5</i>
GH	<i>growth hormone</i>
Gli	gène isolé dans glioblastomes
Gli3A	forme activatrice du gène Gli3
Gli3R	forme répressive du gène Gli3
GnRHR	<i>gonadotropin releasing hormone receptor</i>
α GSU	<i>α-gonadotropin subunit</i>
Hesx1	<i>homeo box gene expressed in ES cells</i>
HIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>
HOS	syndrome Holt-Oram
Hox	<i>homeobox</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
Iro-C	complexe <i>Iroquois</i> chez <i>Drosophila</i>
Irx	<i>Iroquois</i>
LacZ	gène rapporteur codant pour la β -galactosidase
Lef1	<i>lymphoid-enhancing factor 1</i>
LH	hormone lutéinisante
Lim3/Lhx3	<i>lim homeobox protein 3</i>
Lmx1b	<i>lim homeobox 1b</i>

MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
mirr	<i>mirror</i>
néo	<i>néomycine</i>
NeuroD1	<i>neurogenic differentiation factor 1</i>
Nkx2	<i>NK2 transcription factor related</i>
Otx	<i>orthodenticle homolog homeobox</i>
P/D	<i>proximo-distal</i>
P	<i>jour postnatal</i>
Pan1	<i>pancreas protein 1</i>
Pax	<i>paired box gene</i>
PLOD1	<i>procollagen-lysine oxoglutarate dioxygenase 1</i>
Pit1	<i>pituitary-specific positive transcription factor 1</i>
Pitx	<i>pituitary homeobox</i>
POMC	<i>proopiomélanocortine</i>
P-Otx	<i>pituitary Otx related homeobox</i>
Pou3f4	<i>POU domaine, classe 3, facteur de transcription 4 ; (Brn4)</i>
PRL	<i>prolactine</i>
Prop1	<i>paired like homeodomain factor 1</i>
Prx	<i>paired related homeobox 1</i>
Ptc	<i>patched</i>
RaR	<i>récepteur de l'acide rétinoïque</i>
Raldh2	<i>retinaldehyde dehydrogenase 2</i>
Rieg	<i>Rieger syndrome related gene</i>

SF-1	<i>steroidogenic factor 1</i>
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SMO	<i>smoothened</i>
TALE	<i>three amino acid loop extension</i>
Tbx	protéine à boîte T
Tcf1	<i>transcription factor 1</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TH	tyrosine hydroxylase
TSH	<i>thyroid-stimulating hormone</i>
un	<i>undulated</i>
WNT	<i>wingless/int</i>
ZPA	zone d'activité polarisante

Remerciements

Je me dois de remercier plusieurs personnes, sans qui ce manuscrit ne se serait rendu à son étape finale. En premier lieu, **Jacques Drouin**, mon directeur de recherche, et **Chi-Chung Hui** de l'Université de Toronto, pour sa collaboration à ce projet de recherche. Mais aussi, **Jean-François Ouimette**, pour son aide, ses conseils, son appui, mais surtout sa patience. Il a été présent à chacune des étapes de ce travail et m'a servi de guide dans ce terrain broussailleux qu'est la recherche en laboratoire. Je voudrais souligner l'aide que m'a apportée **Aurore L'Honoré**, son appui, mais surtout sa rigueur professionnelle, qui m'a servie de modèle. Je ne peux passer sous silence la patience, le soutien, l'écoute et l'amour inconditionnel qui m'ont été essentiels pour rester debout pendant cette épreuve et qui m'a été fournis par mon compagnon de vie, ma douce moitié. Merci **Yann** de m'avoir supportée pendant cette période de ma vie.

Chapitre 1

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le développement des membres : considérations d'ordre général

Les tétrapodes font partie d'un sous-embranchement des vertébrés et sont caractérisés par la présence de deux paires de membres munis de doigts, les membres antérieurs et les membres postérieurs. La grande diversité retrouvée entre les structures des membres des différents tétrapodes témoigne d'une adaptation à des environnements très variés. Toutefois, la structure générale des membres est conservée : ils sont caractérisés par une division en trois segments. Le segment le plus proximal est le stylopode. Il est formé, chez les mammifères, de l'humérus pour les membres antérieurs et du fémur pour les membres postérieurs. Le segment le plus distal est l'autopode, c'est-à-dire la main du membre antérieur et le pied du membre postérieur. Chacun possède plusieurs doigts (cinq chez la souris et l'humain) composés de phalanges et plusieurs os carpiens ou tarsiens. Le segment central est le zeugopode qui est composé de deux os : le radius et le cubitus dans le cas des membres antérieurs, le tibia et le péroné pour les membres postérieurs.

Le développement des membres a depuis longtemps été questionné par les embryologistes et les spécialistes du développement. En effet, ce système d'étude permet de poser plusieurs questions fascinantes telles que : « Comment sont régulés la croissance et le patterning selon différents axes? ». De plus, les membres, étant à l'extérieur du corps, ils peuvent être manipulés chirurgicalement ou génétiquement

sans altérer la viabilité de l'animal étudié. Les observations des propriétés développementales du membre peuvent être extrapolées à d'autres systèmes puisque les grandes voies de signalisation utilisées dans la régulation de la formation du membre le sont aussi pour plusieurs aspects du développement de l'embryon. Deux modèles animaux ont beaucoup été utilisés dans l'étude du développement des membres. Le poulet permet des manipulations chirurgicales *in ovo* ainsi que l'expression ectopique à l'aide de vecteurs rétro-viraux. La souris quant à elle permet des manipulations génétiques, comme l'inactivation par recombinaison homologue ou conditionnelle avec le système Cre/loxP et la transgénèse.

1.2 Le développement des membres selon trois axes

Le développement des membres débute par la croissance d'un bourgeon qui émerge à partir du flanc. Ce bourgeon est composé de cellules du mésoderme de la lame latérale recouvertes d'un épithélium de surface. Les cellules du bourgeon commencent par proliférer et ensuite, certaines se condensent et se différencient (la chondrogenèse) pour former les éléments squelettiques et les cartilages et les tendons. Les muscles du membre proviennent de cellules du dermomyotome des somites d'où elles délaminent et migrent ensuite pour atteindre le bourgeon où elles se différencieront et fusionneront pour former les fibres musculaires des membres. Au cours du développement, le bourgeon de membre s'allonge selon l'axe proximo-distal (P/D), s'amincit selon l'axe dorso-ventral (D/V) et se différencie selon l'axe antéropostérieur (A/P). Chacun de ces axes possède son centre organisateur, responsable autant de la croissance du bourgeon selon cet axe que de son patterning.

La croissance selon l'axe P/D est stimulée par la sécrétion de molécules émanant de la crête apicale ectodermique (*apical ectodermal ridge* : AER). La spécification du membre en développement selon l'axe A/P est gouvernée par la zone d'activité polarisante (*zone of polarizing activity* : ZPA) située à l'extrémité postérieure et distale du bourgeon. La division D/V du bourgeon est dirigée par des signaux émanant de l'ectoderme du bourgeon. Ainsi, la croissance et le patterning du membre en développement sont deux processus extrêmement imbriqués, parfois difficiles à distinguer.

1.2.1 L'AER et l'axe proximo-distal

1.2.1.1 Les expériences d'embryologie classique

L'AER, ou la crête apicale ectodermique, est une région spécialisée de l'ectoderme du bourgeon de membre, située à son extrémité distale à la frontière des ectodermes dorsal et ventral, et composée de cellules ectodermiques de morphologie distincte. En tant que structure transitoire, l'AER passe par quatre stades distinctifs selon sa morphologie et son expression génique : l'initiation, la maturation, la maintenance et la régression (Altabef et al., 1997; Kimmel et al., 2000). Chez la souris, l'initiation de l'AER débute dès (e9), c'est-à-dire le 9^e jour de développement embryonnaire, au niveau des membres antérieurs et dès e9,5 pour les membres postérieurs lorsque le bourgeon de membre commence à être apparent et que l'expression génique caractéristique de l'AER débute au niveau de l'ectoderme ventral. Durant la maturation, les cellules pré-AER de l'ectoderme ventral migrent

vers l'extrémité distale du bourgeon où elles se condensent pour former l'épithélium stratifié qu'est l'AER (Loomis et al., 1998). La phase de maintenance de l'AER est la période durant laquelle l'AER demeure constant tandis que les cellules mésenchymateuses du bourgeon continuent de proliférer et de se différencier jusqu'à ce que le membre soit complètement formé. Enfin, l'AER entre en régression par mort cellulaire programmée, tout d'abord à la surface de la région interdigitale, jusqu'à former un simple épithélium cuboïdal (Guo et al., 2003). Des études d'embryologie classique ont démontré que l'intégrité de l'AER est essentielle à la croissance et la formation du membre selon l'axe P/D (Saunders, 1948; Todt and Fallon, 1984). L'ablation de l'AER cause la troncation du membre selon l'axe P/D en corrélation avec le stade développemental du bourgeon lors de l'ablation, ce qui indique que l'intégrité de l'AER est constamment requise pour la croissance du membre (Saunders, 1948; Summerbell, 1974). L'échange de deux AERs entre des bourgeons de membre à différents stades développementaux ne cause aucun phénotype particulier, démontrant que les signaux transmis par l'AER sont permissifs et non instructifs quant au développement des membres (Rubin and Saunders J.W.Jr., 1972). Toutefois, la dimension et l'orientation de l'AER sont déterminantes pour la formation du membre. Si on impose une rotation de 90° à l'AER, le membre se formera selon ce nouvel axe (Zwilling, 1956). L'apparition de doigts surnuméraires est souvent corrélée avec un allongement de l'AER selon l'axe A/P (Goetinck, 1964; MacCabe et al., 1975; Lee and Tickle, 1985; Goetinck, 1964; MacCabe et al., 1975; Lee and Tickle, 1985).

1.2.1.2 L'induction de la croissance du bourgeon

Des travaux chez le poulet ont montré que la coopération entre la voie des WNTs/ β -caténine et celle des FGFs est essentielle à l'établissement de l'AER. Chez le poulet, le modèle prône que WNT-2b et WNT-8c, exprimés dans le mésoderme de la lame latérale au niveau des membres antérieurs et postérieurs, signalent via la β -caténine pour restreindre l'expression de *Fgf10* au mésoderme qui formera le bourgeon de membre (Kawakami et al., 2001). *Fgf10* induit l'expression de *Wnt3a* dans l'ectoderme, expression restreinte ensuite dans le sous-groupe de cellules destinées à devenir l'AER (Kengaku et al., 1997; Kengaku et al., 1998). *Wnt3a* agit sur ce sous-groupe de cellules via la β -caténine pour activer l'expression de *Fgf8* (Kengaku et al., 1998). Ce dernier maintient l'expression de *Fgf10* via la voie WNTs/ β -caténine au niveau du mésenchyme, complétant ainsi la boucle de régulation nécessaire au maintien de l'AER. Chez la souris, des données d'analyses génétiques ont montré l'implication de ces deux voies de signalisation dans la formation de l'AER. Par exemple, l'ablation de *Fgf10* ou d'autres molécules impliquées dans cette voie de signalisation inhibe la formation de l'AER (Min et al., 1998; Saxton et al., 2000; Sekine et al., 1999). Les souris dépourvues des composantes de la voie Wnt/ β -caténine, *LRP6* ou *Lef1* et *Tcf1*, présentent des défauts dans la formation de l'AER (Galceran et al., 1999; Pinson et al., 2000). Enfin, β -caténine est essentielle pour l'initiation de l'AER puisque les souris déficientes en β -caténine au niveau de l'ectoderme ne montrent pas les transformations morphologiques caractéristiques du développement de l'AER, ni l'expression de marqueurs moléculaires distinctifs de l'AER, tels que *Bmp2*, *Bmp4*, *En1*, *Msx2*, *Fgf4*, *Fgf8* et *Wnt5a* (Barrow et al., 2003;

Soshnikova et al., 2003). La voie de signalisation des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) est aussi essentielle à l'établissement du patterning dorso-ventral (D/V) de l'ectoderme du bourgeon de membre, étape cruciale lors de la formation de l'AER (Ahn et al., 2001; Pizette et al., 2001). Les BMPs sont des facteurs de croissance appartenant à la famille des *Transforming Growth Factors beta* (TGF β) (pour une revue, voir (Hogan, 1996; Chen et al., 2004)). Au cours du développement des membres, trois membres de cette famille sont exprimés majoritairement : *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7* (Geetha-Loganathan et al., 2006). Alors que BMP2 et BMP4 sont les homologues les plus apparentés à dpp de la drosophile, BMP7 appartient à un autre sous-groupe de la famille (Hogan, 1996; Ducy and Karsenty, 2000). Comme *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7* sont restreints à l'ectoderme ventral, la signalisation est réservée à l'ectoderme ventral, bien que le récepteur BMP1R soit exprimé dans tout l'ectoderme du bourgeon (Ahn et al., 2001; Pizette et al., 2001). Les souris déficientes en *Bmpr1a* au niveau de l'ectoderme ne possèdent pas d'AER (Ahn et al., 2001). Il s'avère que la voie WNT3/ β -caténine est requise pour l'expression de *Bmp2* et *Bmp4* dans l'ectoderme ventral (Barrow et al., 2003). L'induction de l'AER est donc un phénomène complexe impliquant trois des grandes voies de signalisation utilisées au cours du développement embryonnaire, la voie canonique des WNTs, la voie des FGFs et celle des BMPs. Cette induction requiert donc une régulation serrée afin d'assurer sa bonne formation et localisation.

Les étapes de maturation et de maintenance de l'AER sont quelque peu moins connues. Des études ont toutefois montré un rôle de *Engrailed 1* (*En1*) pour la migration et la compaction des cellules progénitrices de l'AER, c'est-à-dire les

cellules de l'ectoderme ventral (Loomis et al., 1998). De plus, on sait que la voie WNT/ β -caténine ainsi que l'expression de *Fgf8* sont nécessaires au maintien de l'AER de telle sorte que si les signaux sont abrogés après que l'AER est complètement formé, il régresse et disparaît (Barrow et al., 2003; Sun et al., 2002). Des signaux émanant du mésoderme sont aussi constamment requis pour la maintenance de l'AER. C'est le cas de *Grem1* et de *Fgf10*. Il a été démontré récemment que l'expression de *Fgf10* dans la région distale du mésoderme du bourgeon est dépendante d'une balance adéquate entre l'expression des gènes du complexe *Hoxd* et de l'expression de *Gli3* (Zakany et al., 2007). On comprend mieux maintenant le relais de la signalisation entre *Fgf10* du mésoderme et *Fgf8* de l'AER. *Sp8* pourrait être responsable de cette communication. *Sp8* est d'abord exprimé dans toutes les cellules de l'ectoderme avant d'être restreint aux cellules de l'AER (Bell et al., 2003; Kawakami et al., 2004). En absence de *Sp8*, les cellules pré-AER expriment *Fgf8* mais cette expression est rapidement perdue et l'AER décline rapidement. Comme *Sp8* est régulé positivement par *Fgf10* et que la région promotrice de *Fgf8* possède des sites de liaison pour les facteurs Sp, on peut penser que *Sp8* est le lien de communication entre *Fgf10* et *Fgf8* (Kawakami et al., 2004). *Grem1* est un membre de la famille DAN des antagonistes des BMPs et il médie la boucle d'autorégulation positive entre les Fgfs de l'AER et Shh de la ZPA (voir **section 1.2.2.5**, p. 23) (Zuniga et al., 1999). La signalisation par les BMPs dans le mésoderme du bourgeon module négativement l'expression de *Fgf8* dans l'AER et cette signalisation par les Bmps est antagonisée par *Grem1* (Pizette and Niswander, 1999). L'inactivation de *Grem1* résulte en la suractivation de la signalisation par les Bmps dans le mésoderme du bourgeon et la régression de l'AER. Récemment, la

signalisation par les Bmps a aussi été impliqué dans la régulation de l'expression de *Grem1* (Nissim et al., 2006).

La régression de l'AER est dirigée par la voie des BMPs, bien que ceux-ci aient été aussi impliqués dans les étapes précoces d'induction de l'AER (Pizette and Niswander, 1999). En effet, la surexpression de *Noggin*, un antagoniste de la signalisation par les Bmps, se traduit par un défaut de maintien de l'AER, autant chez le poulet que chez la souris (Pizette and Niswander, 1999). La participation de la signalisation par les Bmps dans la régulation de l'AER est dynamique : elle est requise pour l'induction de l'AER, ensuite elle est nécessaire pour l'arrêt de l'expression de *Fgfs* dans l'AER et sa régression. Il a été démontré que la signalisation par les Bmps induit l'apoptose dans les régions interdigitales par une modulation de la signalisation des Fgfs (Pajni-Underwood et al., 2007). Ainsi, la régression de l'AER débute au niveau des régions interdigitales, où l'expression des Bmps est la plus forte (Ganan et al., 1996; Pizette and Niswander, 1999).

1.2.1.3 Activité moléculaire de l'AER

De toutes les molécules sécrétées à partir de l'AER, les Fgfs (*Fibroblast Growth Factors*) y jouent un rôle essentiel pour la croissance et le patterning du bourgeon. Les Fgfs sont une famille de facteurs de croissance constitués de 22 membres, comportant tous un motif central d'environ 120 acides aminés qui leur confère une structure tridimensionnelle semblable. Ils peuvent ainsi lier l'héparine et les protéoglycanes héparane sulfate (HSPGs) qui font partie de la matrice extra-

cellulaire (ECM) (Faham et al., 1996; Zhu et al., 1991). Cette liaison aux composantes de l'ECM limite la diffusion des FGFs à partir de la cellule qui les relâche. Par contre, cette même liaison avec la matrice extracellulaire facilite la transduction du signal par l'oligomérisation des Fgfs et leur présentation à leurs récepteurs transmembranaires à tyrosines kinases (les Fgfrs). Chez les vertébrés, on retrouve quatre membres de la famille des Fgfrs : Fgfr1-Fgfr4. Le bourgeon de membre en développement exprime cinq Fgfs (*Fgf4/8/9/17* au niveau de l'AER et *Fgf10* dans le mésenchyme du bourgeon) (Gorivodsky and Lonai, 2003) et deux Fgfrs (*Fgfr1c* et *Fgfr2c* dans le mésenchyme du bourgeon) (Orr-Urtreger et al., 1991). Des études *in vitro* ont montré la capacité d'interaction de Fgfr1c et Fgfr2c avec les Fgfs sécrétés de l'AER (Ornitz et al., 1996; Zhang et al., 2006). Au cours du développement du bourgeon de membre, la cascade de signalisation impliquant les MAP kinases est activée dans les cellules du mésenchyme situées sous l'AER, ce qui démontre que la signalisation impliquant les Fgfs de l'AER est active dans la région distale du mésenchyme du bourgeon (Corson et al., 2003).

Il a été démontré que Fgf-2 (exprimé chez le poulet, mais pas chez la souris), Fgf-4 et Fgf-8 pouvaient chacun remplacer les fonctions de l'AER. L'application de Fgf-2, Fgf-4 ou Fgf-8 ectopiques après l'ablation de l'AER suffit, chez le poulet, à restaurer l'expression normale des gènes et la prolifération cellulaire du mésenchyme et permet la formation d'un membre (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993; Vogel et al., 1996). Dans le même sens, l'application de billes de Fgf-1, Fgf-2, Fgf-4 ou Fgf-8 au niveau du flanc est capable de diriger la formation d'un membre ectopique (Cohn et al., 1995; Ohuchi et al., 1995; Vogel et al., 1996)

Fgf8 est exprimé dans les cellules de l'ectoderme distal du bourgeon de membre dès son émergence et ensuite dans toutes les cellules de l'AER jusqu'à ce qu'il régresse (Crossley and Martin, 1995). Par contre, *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17* sont exprimés seulement une fois que l'AER est formé, dans sa région postérieure, et leur expression cesse au moins un jour avant que l'AER ne régresse (Sun et al., 2000).

1.2.1.4 Les mutants pour les Fgfs

Bien que chacun de ces FGFs contribue vraisemblablement aux fonctions de l'AER, l'inactivation de *Fgf2* (Ortega et al., 1998; Zhou et al., 1998), *Fgf9* (Colvin et al., 2001) ou *Fgf17* (Xu et al., 2000) n'affecte pas le développement des membres des embryons. La même chose n'a pas pu être faite pour *Fgf4* et *Fgf8* puisque l'inactivation de ceux-ci cause une létalité embryonnaire à un stade précoce (Feldman et al., 1995; Meyers et al., 1998).

Le rôle de *Fgf4* au niveau de l'AER a été investigué au moyen du système Cre-loxP, permettant l'ablation de *Fgf4* spécifiquement au niveau de l'AER à l'aide du transgène *Msx2-Cre* (Feldman et al., 1995; Sun et al., 2000). La description du développement du bourgeon de membre des embryons mutants au moyen de marqueurs moléculaires ainsi que les préparations squelettiques effectuées n'ont montré aucun phénotype particulier. Ces résultats réfutent l'hypothèse selon laquelle *Fgf4* est essentiel à la croissance du bourgeon, probablement en raison d'un phénomène de compensation par les autres *Fgfs* exprimés dans l'AER (Niswander et al., 1993; Niswander and Martin, 1993).

Le rôle de *Fgf8* a lui aussi été étudié au moyen de la *Msx2-Cre*, puisque la délétion totale de *Fgf8* est létale au stade de la gastrulation (Sun et al., 1999). L'utilisation de ce transgène a l'avantage de produire la Cre à des temps développementaux différents par rapport au développement des bourgeons selon qu'ils sont antérieurs ou postérieurs. L'inactivation de *Fgf8* se produit avant l'induction de son expression dans l'ectoderme des bourgeons de membre postérieur. Les membres postérieurs des embryons *Msx2-Cre;Fgf8^{flox/flox}* n'auront donc jamais été en présence de Fgf8. Au contraire, l'inactivation de *Fgf8* est effectuée peu de temps après l'induction de son expression dans l'ectoderme des bourgeons de membres antérieurs (Lewandoski et al., 2000). Les différences de phénotype entre les membres antérieurs et postérieurs des souris *Msx2-Cre;Fgf8* permettent de cerner le rôle précoce de Fgf8, lorsqu'il est le seul à être exprimé dans l'AER. Le stylo-pode est sévèrement réduit en taille au niveau du membre postérieur tandis qu'il est moins affecté au niveau des membres antérieurs. Les deux éléments du zeugopode sont faiblement hypoplasiques pour les deux membres et l'autopode perd le doigt #1 au niveau du membre postérieur, ainsi que le doigt #2 ou #3 au niveau du membre antérieur. Ces résultats démontrent donc un rôle essentiel de *Fgf8* à un stade précoce du développement du bourgeon de membre pour l'établissement d'un nombre suffisant de cellules progénitrices nécessaires à la formation des trois éléments squelettiques du membre. Ce rôle peut s'expliquer par la régulation de la détermination du destin cellulaire, la prolifération ou la survie cellulaire (Lewandoski et al., 2000). En accord avec cette interprétation, les membres antérieurs de la souris *RAR-Cre;Fgf8* (Moon and Capecchi, 2000) sont plus affectés que ceux de la souris *Msx2-Cre;Fgf8*. Le transgène *RAR-Cre* dirige l'expression de la Cre avec le

promoteur du récepteur $\beta 2$ de l'acide rétinoïque. La Cre est donc activée plus tôt au cours du développement du bourgeon de membre qu'avec le transgène *Msx2-Cre*, empêchant l'induction de *Fgf8* au niveau de l'AER, ce qui affecte davantage de développement du bourgeon de membre antérieur.

La double inactivation de *Fgf4* et *Fgf8* dans l'AER a montré la nécessité de la présence de ces deux gènes pour la formation des membres (Boulet et al., 2004; Sun et al., 2002). Lorsque *Fgf4* et *Fgf8* ne sont jamais exprimés dans l'AER, *Fgf9* et *Fgf17* ne peuvent compenser cette absence : par conséquent, aucune condensation squelettique n'est formée au-delà de la ceinture pelvienne, bien que l'AER soit morphologiquement intact (Sun et al., 2002).

Ainsi, les différences observées entre les souris *Msx2-Cre;Fgf8* et *Msx2-Cre;Fgf8;Fg4* montrent le rôle de *Fgf8* dans la fenêtre de temps où il est le seul à être exprimé dans l'AER. Un rôle suggéré pour *Fgf8* durant cette période est l'influence qu'il pourrait avoir sur le nombre de cellules participant à la formation du bourgeon lors de son induction (Sun et al., 2002). Cette hypothèse est en accord avec les données recueillies suggérant que la signalisation via les FGFs régule les mouvements et l'adhésion cellulaires dans le bourgeon (Li and Muneoka, 1999; Saxton et al., 2000).

Lorsque chacun des FGFs est inactivé indépendamment, seule l'ablation de *Fgf8* cause un phénotype au niveau des membres. Les autres FGFs sont considérés comme importants lors du développement normal, mais fonctionnellement

redondants. Afin de tester cette redondance fonctionnelle entre *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17*, les souris *Msx2-Cre;Fgf4;Fgf9^{-/-};Fgf17^{-/-}* ont été générées et ne possèdent aucun phénotype particulier au niveau des membres (Mariani et al., 2008). Ainsi, *Fgf8* est suffisant pour le développement normal des membres. La contribution de *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17* au développement des membres a donc été investiguée par leur inactivation en combinaison avec *Fgf8* à l'aide du transgène *Msx2-Cre* qui permet l'activation de la Cre après une expression transitoire de *Fgf8* jusqu'à e9,5 dans le bourgeon de membre antérieur. Par contre, comme la Cre est activée avant l'expression de *Fgf8* dans les membres postérieurs, ceux-ci ne sont pas formés. La variété de phénotypes obtenus au niveau des membres antérieurs peut être classée selon leur sévérité (Mariani et al., 2008), démontrant que, bien qu'ils soient redondants, chacun des FGFs de l'AER participe au développement normal du membre. Leur contribution dépend autant de leur domaine, leur niveau et leur temps d'expression que de leurs spécificités de liaison aux récepteurs du mésenchyme.

1.2.1.5 L'AER et le patterning selon l'axe proximo-distal : 3 modèles

Les données recueillies à propos des mutants *Msx2-Cre;Fgf8* (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002) contredisent le modèle classique concernant le patterning selon l'axe P/D : le modèle de la zone de progrès (PZ) (Summerbell, 1974). Selon ce modèle, les cellules sous l'AER reçoivent des signaux mitogéniques de la part de l'AER, elles sont donc indifférenciées et en prolifération. Comme la zone de progrès demeure constante et que le bourgeon croît dans l'axe P/D, les cellules quittent la zone de progrès séquentiellement pour former un après l'autre les trois éléments du

membre : le stylopode, le zeugopode et l'autopode. Ainsi, plus les cellules seront demeurées longtemps dans la zone de progrès, plus elles formeront les éléments distaux du membre. Selon ce modèle, les Fgfs sécrétés à partir de l'AER sont des facteurs permissifs qui permettent aux cellules de la zone de progrès d'acquérir un destin de plus en plus distal puisque l'application de billes de FGFs recombinants peut remplacer les fonctions de l'AER (Niswander et al., 1993; Fallon et al., 1994).

Toutefois, la perte ou la forte hypoplasie des éléments proximaux chez les doubles mutants *Msx2-Cre;Fgf8* alors qu'on observe toujours la présence d'éléments distaux contredit ce modèle qui prône la spécification des éléments distaux seulement après que les éléments proximaux se sont formés (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002). Ces données supportent davantage le modèle de pré-spécification, dans lequel tous les éléments des membres sont spécifiés très tôt lors de la formation du bourgeon. Selon ce modèle, l'AER est responsable de l'expansion des cellules de chacune de ces zones. Ainsi, la perte du fémur dans les membres postérieurs des embryons *Msx2-Cre;Fgf8* s'explique par l'absence de signalisation par *Fgf8*, au moment où il est normalement le seul à être exprimé par l'AER et donc avant l'induction de l'expression des autres Fgfs. C'est cette absence d'expression pendant une courte période de temps qui prévient l'expansion du domaine spécifié comme proximal et destiné à former le fémur (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002).

Le troisième modèle tentant d'expliquer la croissance du bourgeon de membre et le patterning des éléments squelettiques selon l'axe P/D fait appel à l'opposition de signaux proximaux et distaux. Selon ce modèle, des signaux proximaux, tels que

l'acide rétinoïque (AR) et les gènes *Meis1* et *Meis2*, sont responsables de la formation des éléments squelettiques proximaux tandis que des signaux distaux, comme les Bmps, les Fgfs et les Wnts favorisent le développement des structures distales du membre. Au fur et à mesure que le bourgeon croît selon l'axe P/D, les régions de signalisation se distancent l'une de l'autre, ce qui mène à la formation des trois segments du membre : le stylopode, le zeugopode et l'autopode. Plusieurs données appuient ce modèle. Un excès généralisé d'AR chez la souris provoque la croissance de membres ectopiques (Niederreither et al., 1996; Rutledge et al., 1994), ce qui suggère un rôle précoce de l'AR dans la croissance du bourgeon. Dans le même sens, le traitement de bourgeons de membre précoces avec des antagonistes de la signalisation par l'AR, ou des inhibiteurs de sa synthèse ou encore l'inactivation génétique de l'enzyme synthétisant l'AR (*Raldh2*) mène à la formation de membres tronqués ou absents (Niederreither et al., 1999; Helms et al., 1996; Stratford et al., 1996). Lorsque le bourgeon croît, la signalisation via l'AR demeure restreinte au domaine proximal du bourgeon (Berggren et al., 1999; Mendelsohn et al., 1991; Mendelsohn et al., 1992; Rossant et al., 1991; Swindell et al., 1999) et promeut l'expression différentielle des gènes *Meis* au domaine proximal du bourgeon (Mercader et al., 2000). Le bourgeon de membre précoce reçoit aussi les signaux des Fgfs de l'AER et les cellules entrent ainsi dans la formation du stylopode. Quand le bourgeon croît, les cellules deviennent alors assez distantes de la source d'AR pour que les Fgfs soient capables d'inhiber la transcription des gènes *Meis*. L'expression des gènes *Hox10* à *13* au niveau du zeugopode et de l'autopode participe aussi à l'inhibition de l'expression des gènes *Meis* (Capdevila et al., 1999). Plus tard au

cours du développement du bourgeon, la transition entre le zeugopode et l'autopode est indépendante, mais encore sensible, à l'AR.

L'observation du patron d'expression de *Meis1* chez les différents mutants pour les Fgfs a montré que malgré une taille comparable des bourgeons entre les mutants, la taille du domaine distal du bourgeon (négatif pour l'expression de *Meis1*) diminue avec la perte d'allèles codant pour les Fgfs de l'AER (Mariani et al., 2008). De plus, l'application de billes de Fgfs dans le domaine d'expression de *Meis1*, entraîne la répression de *Meis1* (Mercader et al., 2000). Ces résultats suggèrent un rôle des FGFs dans la détermination du destin distal des cellules du bourgeon. Ces données argumentent en faveur d'un rôle instructif des Fgfs de l'AER dans la détermination d'un destin distal des cellules du bourgeon plutôt que d'un rôle permissif de prolifération cellulaire comme dans le modèle de la zone de progrès. De plus, l'absence de zeugopode alors que le stylopode et l'autopode sont formés dans le membre antérieur des embryons *Msx2-Cre;Fgf8^{-/-};Fgf4^{-/-};Fgf9^{+/-}* n'est pas réconciliable avec le modèle de la zone de progrès qui décrit la formation du membre séquentiellement à partir des éléments proximaux vers les éléments distaux (Mariani et al., 2008). Par contre, ces données argumentent en faveur du modèle des deux signaux.

En somme, la formation du membre selon l'axe proximo-distal est un processus hautement régulé et imbriqué dans la croissance du bourgeon. Un débalancement des voies de signalisation, soit par inactivation soit par une croissance

plus faible du bourgeon, résulte en la formation d'un membre où des éléments squelettiques sont hypoplasiques et parfois mêmes absents.

1.2.2 La ZPA et l'axe antéropostérieur

La zone d'activité polarisante (ZPA) est une région du mésenchyme située du côté postérieur de l'extrémité distale du bourgeon de membre, sans toutefois présenter de morphologie distincte. La greffe de la ZPA du côté antérieur du bourgeon d'un poulet hôte mène à la duplication en miroir du côté postérieur de la région distale du membre, montrant que les facteurs sécrétés par la ZPA sont impliqués dans le patterning du membre selon l'axe (A/P) (Saunders J.W.Jr. and Gasseling M.T., 1968). Afin d'expliquer l'impact de cette région sur le développement des structures selon l'axe antéropostérieur, Wolpert (Wolpert, 1969) a élaboré un modèle moléculaire proposant la diffusion à partir de la ZPA d'une petite molécule, appelée morphogène, qui créerait un gradient de concentration au travers du mésenchyme du bourgeon. La polarité et le destin des cellules qui formeront les doigts seraient déterminés par la réponse cellulaire à des seuils du gradient.

1.2.2.1 Activité moléculaire de la ZPA : Shh

Bien que l'application de billes trempées dans l'AR dans le bourgeon de membre de poulet agit comme la transplantation de la ZPA (Tickle et al., 1982), la production d'AR spécifiquement par la ZPA n'a pas pu être démontrée. Le facteur sécrété spécifiquement par la ZPA du bourgeon de membre des vertébrés a été

identifié comme étant *Sonic hedgehog* (*Shh*), un homologue du gène *Drosophila hedgehog* (Riddle et al., 1993). La greffe de fibroblastes exprimant *Shh* agit comme la transplantation de la ZPA au niveau antérieur du bourgeon et résulte en la duplication en miroir des doigts. De plus, l'inactivation de *Shh* chez la souris résulte en un phénotype complexe incluant la perturbation du développement distal du membre comprenant l'autopode (Chiang et al., 1996; Chiang et al., 2001; Kraus et al., 2001).

1.2.2.2 Positionnement de la ZPA

L'AR semble primordial pour les premières étapes du bourgeonnement du membre et le positionnement de la production de *Shh* puisque l'inactivation de *Raldh2*, le gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse de l'AR, empêche la formation du bourgeon et l'activation de la signalisation par *Shh* (Niederreither et al., 1999). L'administration d'AR suffit pour rétablir, dans ce cas, l'initiation de la croissance du bourgeon de membre antérieur (Niederreither et al., 2002). Ces auteurs ont alors proposé que l'AR et le facteur de transcription de type bHLH *dHand* activent l'expression de *Shh* au niveau du mésenchyme postérieur et distal du bourgeon. L'inactivation de *dHand* prévient l'activation de *Shh* et l'expression ectopique de *dHand* au niveau antérieur du bourgeon résulte en l'expression ectopique de *Shh* (Charite et al., 2000; Fernandez-Teran et al., 2000; McFadden et al., 2002). Alors que *dHand* est d'abord exprimé dans le mésenchyme du flanc et tout au long de l'axe A/P du bourgeon lors de son émergence (révisé par (Cohn, 2000), son expression est rapidement restreinte au niveau postérieur pendant que l'expression du

répresseur transcriptionnel à doigt de zinc *Gli3* est activée du côté antérieur du bourgeon (te Welscher et al., 2002a). Les souris déficientes en *Gli3* montrent une maintenance de l'expression de *dHand* dans la région antérieure du bourgeon et l'activation de gènes normalement restreints au domaine postérieur (*5'HoxD*, *Gremlin*) avant l'induction d'une expression ectopique de *Shh* dans le domaine antérieur (te Welscher et al., 2002a; Zuniga and Zeller, 1999). De plus, lors de l'inactivation de *dHand*, l'expression de *Gli3* et *Alx4*, un facteur de transcription à homéodomaine *paired*, est étendue vers la région postérieure (te Welscher et al., 2002a). En fait, plusieurs gènes dont les patrons d'expression sont restreints à la région postérieure et qui sont des cibles potentielles de *Shh* sont exprimés en fait avant l'induction de *Shh*. *5'HoxD*, *Bmp2*, *Gremlin* et les *Fgfs* de la région postérieure de l'AER sont activés avant et indépendamment de la signalisation via *Shh* (Chiang et al., 2001; Sun et al., 2000; Zuniga et al., 1999). Toutefois, la perte rapide de l'expression de ces gènes chez les souris déficientes en *Shh* montre l'importance de ce dernier dans le maintien de leur expression durant la croissance et la morphogenèse du bourgeon de membre.

1.2.2.3 La signalisation par Shh

La transduction et la régulation de la signalisation à partir de *Shh* sont étroitement contrôlées par des interactions protéiques. Des études biochimiques ont montré que la protéine pleine longueur *Shh* procède à un auto-clivage protéique relâchant un fragment C-terminal et un fragment N-terminal actif, lequel se lie de façon covalente à une molécule de cholestérol (Lee et al., 1994; Porter et al., 1995;

Porter et al., 1996). Bien qu'on puisse penser que l'attachement à une molécule de cholestérol résulte en une rétention à la membrane plasmique, une souris mutante qui exprime une variation de Shh incapable de se lier au cholestérol montre un développement interrompu des doigts antérieurs tandis que les doigts postérieurs sont normaux (Lewis et al., 2001), démontrant l'importance du cholestérol dans la transmission du signal sur de longues distances. D'autres auteurs ont proposé que plusieurs fragments N-terminal de Shh liés au cholestérol s'accumulent à l'intérieur de radeaux lipidiques, ce qui formerait des complexes solubles capables de diffuser (Zeng et al., 2001).

La signalisation sur de longues distances est limitée par plusieurs mécanismes. D'abord, la signalisation via Shh induit l'activation de la transcription de son récepteur, le récepteur Ptc (Goodrich et al., 1996). En absence de signalisation par Shh, Ptc inhibe la protéine à sept domaines transmembranaires *Smoothed* (Smo) et le clivage constitutif de Gli est réalisé, produisant la forme courte de Gli qui est alors un répresseur transcriptionnel. Lorsque Shh se lie à son récepteur Ptc, l'inhibition de Smo est levée et le clivage de Gli est inhibé, générant la forme longue de Gli, un activateur transcriptionnel. Parmi les gènes cibles de Shh se trouve Ptc lui-même, réduisant ainsi la diffusion de Shh. De plus, chez les vertébrés, la protéine Hip, capable de lier Shh, est transcrite suite à une signalisation par Shh, créant une deuxième boucle de régulation négative limitant la diffusion de Shh (Chuang and McMahon, 1999).

1.2.2.4 Le patterning selon l'axe antéropostérieur

Trois gènes de la famille *Gli* sont exprimés dans le mésenchyme du bourgeon de membre : *Gli1/2/3*. Les souris mutantes pour *Gli1* et/ou *Gli2* ne présentent aucun phénotype particulier au niveau des membres (Park et al., 2000). La signalisation par *Shh* inhibe le clivage constitutif de *Gli3*, générant la forme longue activatrice de *Gli3* (*Gli3A*) au détriment de la forme courte, clivée et répressive (*Gli3R*). Ainsi, la signalisation par *Shh* crée un gradient d'activation de gènes cibles du postérieur vers l'antérieur du bourgeon tout en créant un gradient de répression transcriptionnelle via *Gli3R* allant de l'antérieur vers le postérieur (Wang et al., 2000). L'étude des souris doubles mutantes *Shh*^{-/-};*Gli3*^{-/-} a montré des actions antagonistes entre SHH et *Gli3* dans le contrôle du patterning antéropostérieur. L'expression de plusieurs gènes normalement restreints au domaine postérieur du bourgeon (tels que 5'*HoxD*, *Hoxa13* et *Gremlin*) ainsi que le patterning distal du membre sont rétablis par l'ablation d'un ou deux allèles de *Gli3* chez les souris déficientes en *Shh* (te Welscher et al., 2002b). Comme les membres des souris *Gli3*^{-/-};*Shh*^{-/-} présentent une polydactylie indiscernable des membres des souris *Gli3*^{-/-}, alors que les souris déficientes en *Shh*, elles, ne possèdent qu'un rudiment de doigt que l'on ne peut identifier et un zeugopode tronqué, ces résultats ont montré que *Shh* fonctionne normalement pour empêcher la répression des gènes « postérieurs » par *Gli3R* et ont confirmé que *Gli3* agit avant *Shh*.

1.2.2.5 Interactions entre *Shh* de la ZPA et les *Fgfs* de l'AER

Non seulement *Shh* signale vers le mésenchyme du bourgeon et régule le patterning, mais il maintient et propage sa propre expression en participant à une boucle de régulation positive via les *Fgfs* exprimés dans l'AER. La signalisation est relayée vers l'AER par *Gremlin*, un antagoniste des BMPs exprimé dans le mésenchyme. Cet antagonisme de l'action de *Bmps* permet l'expression de *Fgf4*, *Fgf9* et *Fgf17* dans la partie postérieure de l'AER. En effet, les souris *Shh*^{-/-} montrent la perte d'expression de *Fgf4*, alors que celle de *Fgf9* et *Fgf17* est à peine détectable (Sun et al., 2000; Zuniga et al., 1999; Xu et al., 2000). Toutefois, l'expression de *Fgf8* est intacte, démontrant qu'elle est indépendante d'une signalisation via *Shh* (Sun et al., 2000). En retour, la signalisation par les *Fgfs* de l'AER participe au maintien et la propagation distale de l'expression de *Shh* dans la ZPA au cours de la croissance du bourgeon. Le modèle d'une boucle d'autorégulation positive entre les *Fgfs* de l'AER et *Shh* du ZPA est attirant puisqu'il offre un mécanisme moléculaire simple conjuguant l'action coordonnée de deux centres organisateurs dans la croissance du bourgeon. Toutefois, l'expression de *Shh* est maintenue chez les souris *Msx2-Cre;Fgf4* (voir **section 1.2.1.4**, p. 11) et les membres des souris *Fgf9*^{-/-} et *Fgf17*^{-/-} sont normaux, ce qui contredit ce modèle (Sun et al., 2000; Xu et al., 2000; Zuniga et al., 1999). On ne peut toutefois pas rejeter l'hypothèse selon laquelle l'action combinée de plusieurs *Fgfs* participe au maintien de *Shh* dans la ZPA. Il a été proposé que *Fgf8*, le seul *Fgf* de l'AER exprimé avant l'apparition de *Shh* au niveau de la ZPA, soit responsable de l'induction et du maintien de l'expression de *Shh* (Crossley, 1996, Vogel, 1996). L'expression de *Shh*

chez les souris *Msx2-Cre;Fgf8* est retardée d'au moins 2 somites. *Fgf8* est donc requis pour l'induction de *Shh* au niveau du ZPA, mais en son absence d'autres *Fgfs* de l'AER peuvent prendre le relais (Lewandoski, 2000).

1.2.3 L'ectoderme et l'axe dorso-ventral

Des interactions complexes entre le mésoderme et l'ectoderme gouvernent aussi le patterning du bourgeon de membre en développement selon l'axe dorso-ventral (D/V) (Chen and Johnson, 1999). Avant même l'induction d'un bourgeon de membre, des signaux inductifs émanant du mésoderme sont nécessaires à l'établissement d'un ectoderme spécialisé, divisé selon l'axe D/V (Geduspan and MacCabe, 1987; Geduspan and MacCabe, 1989; Michaud et al., 1997). Il a été démontré que les signaux déterminant l'ectoderme ventral du bourgeon de membre proviennent du mésoderme de la lame latérale alors que le mésoderme somitique médial sécrète les molécules responsables de la «dorsalisation» de l'ectoderme (Michaud et al., 1997). BMP4 et BMP7 sont exprimés dans le mésoderme de la lame latérale et l'ectoderme le recouvrant avant l'induction du bourgeon de membre, ce qui les qualifie correctement comme facteurs responsables de la «ventralisation» de l'ectoderme (Ahn et al., 2001; Pizette et al., 2001). En fait, l'inactivation de leur récepteur, *Bmpr1-a*, spécifiquement dans l'ectoderme ventral par l'utilisation de la Cre contrôlée par le promoteur de *Pou3f4* (*Brn4*), a montré la nécessité de la signalisation via les BMPs pour l'induction de *Engrailed 1* (*En1*) qui est exprimé spécifiquement dans l'ectoderme ventral du bourgeon (Ahn et al., 2001; Davis et al., 1991; Gardner and Barald, 1992; Loomis et al., 1996). De plus, l'inactivation de *En1*

engendre la transformation de l'ectoderme ventral du bourgeon de membre en ectoderme dorsal par, du moins en partie, la suppression de l'expression de *Wnt7a* et mène à la formation de membres bidorsaux (Cygan et al., 1997; Loomis et al., 1996; Loomis et al., 1998). En effet, dans un bourgeon de membre normal *Wnt7a* est exprimé spécifiquement au niveau de l'ectoderme dorsal (Dealy et al., 1993; Parr et al., 1993), et l'inactivation de celui-ci entraîne la formation d'un membre biventral (Parr and McMahon, 1995). La signalisation via WNT7A à partir de l'ectoderme dorsal est responsable de l'induction de *Lmx1b*, un facteur de transcription avec un domaine LIM, dans la région dorsale du mésoderme du bourgeon (Riddle et al., 1995; Vogel et al., 1995). De la même façon, l'inactivation de *Lmx1b* cause un phénotype de membre biventral, autant chez la souris que l'humain (Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998). En somme, la voie de signalisation des BMPs entraîne l'expression de *En1* au niveau de l'ectoderme ventral du bourgeon, ce qui restreint l'expression de *Wnt7a* à l'ectoderme dorsal, responsable de la spécification du mésoderme dorsal par l'induction de *Lmx1b*.

1.3 La spécification de l'identité des membres

1.3.1 La famille des gènes *Pitx*

1.3.1.1 Propriétés générales des facteurs de transcription *Pitx*

Les facteurs de transcription de la famille des protéines à homéodomaine sont impliqués dans plusieurs processus développementaux (Banerjee-Basu and Baxevanis, 2001). Leur implication dans ces processus relève de leur aptitude à moduler les patrons d'expression des gènes cibles de façon spatiale et temporelle (Gehring et al., 1994; Drouin et al., 1998). Tous les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un homéodomaine, c'est-à-dire d'un motif basique hélice-tour-hélice (bHTH), responsable de la spécificité de liaison à l'ADN. La famille des gènes *Pitx* fait partie de la classe *paired* des protéines à homéodomains, et de la sous-famille bicoïde en raison du degré d'homologie entre leur homéodomaine et celui de *bicoïd* de la drosophile. Cette sous-famille comprend aussi, chez les mammifères, les gènes *gooseoid* (*gsc*), *Otx1* et *Otx2* (Drouin et al., 1998). La sous-famille bicoïde est définie par la présence d'une lysine à la position 50 de l'homéodomaine (position 9 de l'hélice de reconnaissance). Cette lysine se place dans le sillon majeur de l'ADN et dicte la spécificité de liaison en reconnaissant le doublet CC de la séquence consensus TATT/GCC (Treisman et al., 1989). La famille des *Pitx* comprend trois membres : *Pitx1*, *Pitx2* et *Pitx3* (voir **figure 1.1**, p. 27). Les trois protéines partagent un degré d'homologie très élevé quant à la

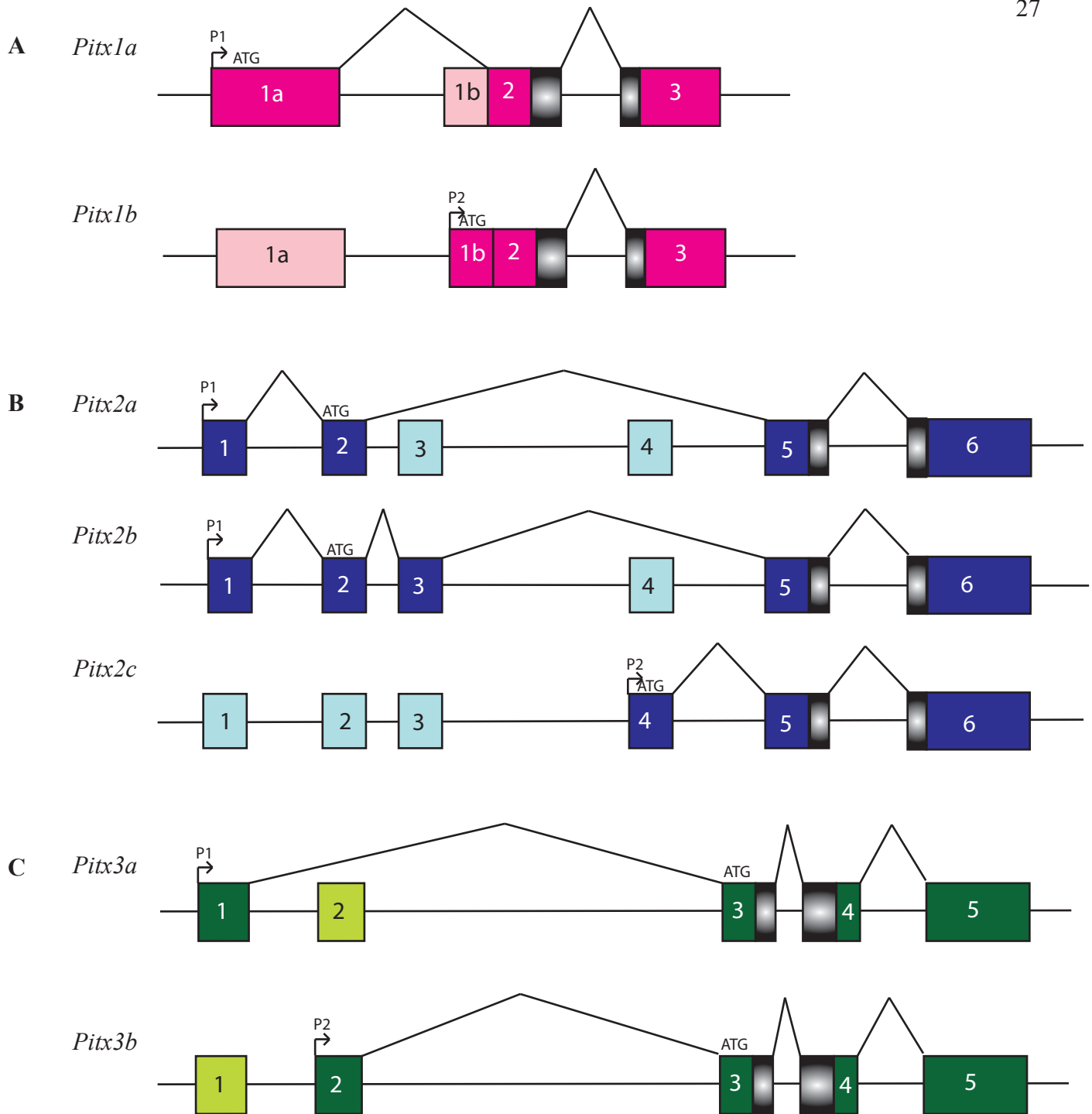



Figure 1.1. Organisation génomique des gènes de la famille *Pitx*. (A) Le gène *Pitx1* code pour deux isoformes possédant des régions N-terminales différentes en raison de l'utilisation d'un promoteur et d'un ATG différent (P1 et P2). Inspiré de Tremblay et al., 2000. (B) *Pitx2* code pour 3 isoformes différents : *Pitx2a* et *b* diffèrent par épissage alternatif tandis que *Pitx2c* provient de l'utilisation d'un promoteur et d'un ATG différents. L'homéodomaine de *Pitx2* possède 95 % d'homologie avec *Pitx1* alors que la protéine entière possède 70 % d'homologie. Inspiré de Drouin et al., 1998 et Liu et al., 2003. (C) Les deux isoformes de *Pitx3* codent pour une seule même protéine, utilisant le même ATG, mais diffèrent puisqu'ils sont dirigés par deux promoteurs différents (P1 et P2) qui confèrent leur spécificité d'expression dans certains tissus. L'homéodomaine de *Pitx3* possèdent 93 % d'homologie avec *Pitx1* alors que la protéine entière possède 57 % d'homologie. Inspiré de Coulon et al., 2007 et Drouin et al., 1998. Les boîtes aux couleurs foncées correspondent aux exons transcrits pour un isoforme. La boîte  représente l'homéodomaine de la protéine.

séquence de leur homéodomaine (58/60 acides aminés). Toutefois, elles divergent dans leurs séquences amino- et carboxy-terminales (Tremblay et al., 2000).

1.3.1.2 *Pitx1*

Pitx1 a été cloné parallèlement par trois groupes distincts : d'abord, au laboratoire, comme facteur de transcription liant l'élément CE3 du promoteur de la pro-opiomélanocortine (POMC) et activant sa transcription (*pituitary homeobox 1*) (Lamonerie et al., 1996) ; ensuite lors d'un crible double-hybride cherchant à identifier des protéines interagissant avec le domaine N-terminal de Pit1, un facteur de transcription à homéodomaine de la famille POU nécessaire à la différenciation terminale des cellules thyrotropes, somatotropes et lactotropes de l'hypophyse (*P-Otx*) (Szeto et al., 1996) ; puis lors d'un crible simple-hybride pour des facteurs interagissant avec la séquence de terminaison de la transcription mitochondriale, qui s'est avérée contenir la séquence consensus de liaison à haute affinité des homéoprotéines (*Backfoot*) (Shang et al., 1997).

Pitx1 possède un domaine riche en prolines dans sa région N-terminale, en plus de deux autres domaines riches en prolines adjacents à deux domaines riches en sérines dans sa région C-terminale. Ces deux régions sont soupçonnées d'être des régions de transactivation (Lamonerie et al., 1996). *Pitx1* est donc un fort activateur transcriptionnel, présent dans toutes les cellules de l'hypophyse (Tremblay et al., 1998). Par exemple, *in vitro*, *Pitx1* est capable d'activer la transcription de plusieurs promoteurs hypophysaires tels que celui de la sous-unité α de la glycoprotéine

(l' α GSU), des sous-unités β de la l'hormone lutéinisante (β LH), de l'hormone folliculo-stimulante (β FSH) et de la thyroïdostimuline (β TSH), du récepteur de la gonadolibérine (GnRHR), de l'hormone de croissance (GH) et de l'enhancer de Pit1, en plus de celui de la POMC (Tremblay et al., 1998; Lamonerie et al., 1996). C'est en participant à un code combinatoire avec des protéines spécifiques à chacune des lignées cellulaires de l'hypophyse que Pitx1 participe à l'activation transcriptionnelle de gènes spécifiques à ces lignées. Ainsi, Pitx1 synergise avec Pit1 dans les cellules somato-lactotrophes sur les promoteurs de la prolactine (PRL) et de l'hormone de croissance (GH), bien que cette interaction transcriptionnelle ne soit pas observée sur le promoteur de la β TSH ou sur le promoteur/enhancer de Pit1 (Tremblay et al., 1998; Szeto et al., 1996). De même, Pitx1 synergise avec l'hétérodimère NeuroD1/Pan1 (Poulin et al., 1997; Poulin et al., 2000) et Tpit (Tbox) (Lamolet et al., 2001) sur le promoteur de la *POMC* dans les corticotropes ainsi qu'avec le récepteur nucléaire orphelin SF-1 (*steroidogenic factor 1*) et le facteur à doigts de zinc Erg-1 sur le promoteur de la sous-unité β de l'hormone lutéinisante (LH β) dans les cellules gonadotropes (Tremblay and Drouin, 1999). C'est donc en interagissant avec différentes protéines spécifiques à chacun des types cellulaires de l'hypophyse que Pitx1 participe à l'activation de la transcription de plusieurs hormones hypophysaires (Tremblay et al., 1998).

Des expériences avec ARN anti-sens ont montré l'importance de Pitx1 pour l'expression de *Lim3/Lhx3*, un gène important pour le développement de l'hypophyse (Sheng et al., 1996; Tremblay et al., 1998), plaçant ainsi Pitx1 en amont d'une cascade de régulation nécessaire au développement de l'organe. De plus, une

région régulatrice qui s'étend jusqu'à - 4,2 kb du site d'initiation de la transcription de *Pitx1* a été identifiée comme étant capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur dans les domaines antérieurs d'expression endogène de *Pitx1*, soit le stomodeum et le mésenchyme de la première arche branchiale et ses dérivés (voir plus loin) (Goodyer et al., 2003). L'étude de cette région promotrice a montré qu'elle contenait des séquences consensus de liaison à l'ADN des facteurs de transcription de la famille bicoïde. Des études *in vitro* ont confirmé un mécanisme d'auto-régulation de *Pitx1* servant soit à l'établissement soit au maintien de l'expression de *Pitx1* dans son domaine antérieur.

Pitx1 possède deux domaines d'expression, l'un dans la région antérieure de l'embryon, l'autre dans la région postérieure (voir **figure 1.3 A**, p. 40) (Lanctôt et al., 1997). L'expression de *Pitx1* dans le domaine antérieur débute dès e8,0 au niveau de l'endoderme viscéral antérieur et du stomodeum. À e9,0, *Pitx1* est détecté dans le mésenchyme de la première arche branchiale et de la région proximale de la mandibule. L'expression de *Pitx1* est ensuite maintenue dans les dérivés de la première arche branchiale et ceux du stomodeum, c'est-à-dire au niveau du cartilage de Meckel et des muscles de la langue, ainsi qu'au niveau des épithélia olfactifs, du nasopharynx, du palais, de la langue, des dents, des glandes submandibulaires et au niveau de l'adénohypophyse (Lanctôt et al., 1997; Mitsiadis and Drouin, 2008). Dans le domaine postérieur de l'embryon, *Pitx1* est détecté lors de la gastrulation à partir de e6,8, dans le mésoderme formé à partir de la ligne primitive. L'expression de *Pitx1* est spécifique au mésoderme postérieur de la lame latérale duquel émergeront les membres postérieurs (voir **figure 1.3 A**, p. 40). *Pitx1* se retrouve

également dans les dérivés du mésoderme de la lame latérale postérieure, soit les muscles de la paroi abdominale, la vessie, l'estomac, l'intestin et le tubercule génital (Lancôt et al., 1997).

1.3.1.3 *Pitx2*

Pitx2 a été cloné par plusieurs groupes indépendants. En premier lieu, lors d'un clonage positionnel effectué par un groupe qui cherchait à identifier le gène responsable du syndrome de Rieger, un syndrome d'haploinsuffisance autosomal-dominant causant chez l'humain des anomalies de la chambre antérieure de l'œil, des glaucomes, une hypoplasie de la dentition, un léger dysmorphisme craniofacial et des anomalies de la cicatrice ombilicale (*Rieg*) (Semina et al., 1996). Les patients avec le syndrome de Rieger portent des mutations dans *PITX2*, la plupart localisées dans la région codante pour l'homéodomaine de la protéine (Amendt et al., 2000; Semina et al., 1996). Puis, *Pitx2* est sorti d'un criblage pour identifier de nouvelles protéines appartenant à la famille *paired* des protéines à homéodomaine de la super-classe PRX (*Otlx2*) (Muccielli et al., 1996). Aussi, lors d'un criblage d'une banque d'ADN complémentaire provenant d'hypophyses adultes de souris accompli par un groupe cherchant à identifier de nouvelles protéines à homéodomaine (*Ptx2*) (Gage and Camper, 1997). Et, finalement, il a été identifié comme gène cible de *All1*, un gène impliqué dans la leucémie aiguë (*Arp1*) (Arakawa et al., 1998).

Pitx2 est connu comme étant un activateur transcriptionnel et plusieurs de ses gènes cibles ont été identifiés. Il est capable, tout comme *Pitx1*, d'activer la

transcription en liant plusieurs promoteurs hypophysaires en simple transfection : α GSU, LH β , FSH β , GnRH-R, PRL, GH, TSH β et POMC (Tremblay et al., 2000). De plus, il peut synergiser avec SF-1 ou Erg-1 sur le promoteur de LH β , avec Pit-1 sur le promoteur de PRL, avec NeuroD/Pan1 sur le promoteur de POMC et avec Lim3/Lhx3 sur le promoteur de l' α GSU (Tremblay et al., 2000; Amendt et al., 2000; Lin et al., 1999; Amendt et al., 1998). Chez l'humain, des gènes cibles de *PITX2*, hors de l'hypophyse, ont aussi été identifiés : le gène codant pour la procollagène lysyl hydroxylase (*PLOD*) ainsi que le gène *Dlx2* (Hjalt et al., 2001). *PLOD1* code pour une hydroxylase du collagène qui joue un rôle dans la spécificité de la matrice extracellulaire et produit une fondation pour la morphogenèse des tissus et des organes alors que *Dlx2* encode un facteur de transcription exprimé dans les tissus mésenchymateux et épithéliaux du maxillaire et de la mandibule, ainsi que dans le diencephale. *Dlx2* a aussi été décrit comme un régulateur du développement des arches branchiales.

Il existe plusieurs isoformes de *Pitx2* : trois chez la souris (*Pitx2a*, *b* et *c*) (voir **figure 1.1 B**, p. 27) , deux chez le poulet (*Pitx2a* et *c*) et quatre chez l'Humain (*Pitx2a*, *b*, *c*, et *d*) (Semina et al., 1996; Gage and Camper, 1997; Arakawa et al., 1998; Cox et al., 2002; Drouin et al., 1998; Liu et al., 2003). Chez la souris, *Pitx2a* et *Pitx2b* diffèrent en deux points : *Pitx2a* contient 18 nucléotides à son extrémité 5' qui ne se retrouvent pas dans *Pitx2b* alors que *Pitx2b* contient une insertion de 138 paires de bases dans sa région N-terminale, résultante d'un épissage alternatif. Ainsi, ces deux isoformes de *Pitx2* codent pour des protéines de 271 et 317 acides aminés (Gage and Camper, 1997). *Pitx2c* provient de l'utilisation d'un promoteur alternatif situé

tout juste en amont de l'exon 4 (Kitamura et al., 1999). Ainsi, les trois isoformes de *Pitx2* diffèrent quant à leur région N-terminale, mais sont identiques dans leur homéodomaine et leur région C-terminale.

Pitx2 est exprimé dans de nombreux tissus au cours du développement (voir **figure 1.2 A-D**, p. 34). Il est retrouvé dans le mésoderme de la lame latérale, les dérivés de la première arche branchiale, l'œil, le cerveau, l'hypophyse, la mandibule, le cœur et les muscles squelettiques (Arakawa et al., 1998; Gage and Camper, 1997; Kitamura et al., 1999; Muccielli et al., 1996; Semina et al., 1996). Tôt au cours du développement, *Pitx2c* est le seul isoforme exprimé asymétriquement, dans le mésoderme de la lame latérale gauche et ses dérivés (le cœur et l'intestin). Les trois isoformes partagent un patron d'expression symétrique semblable dans le mésoderme de la tête et de la lame latérale (Kitamura et al., 1999).

Le rôle de *Pitx2* au cours du développement a été investigué par recombinaison génétique chez la souris (Gage et al., 1999). Puisque la délétion totale de *Pitx2*, par délétion de la séquence codante pour l'homéodomaine de la protéine, entraîne la mort embryonnaire vers e14,5 en raison de problèmes cardiaques et que les embryons présentent une éviscération causée par un défaut de fermeture de la paroi abdominale (voir **figure 1.2 J, K**, p. 34), le rôle de *Pitx2* a aussi été investigué au moyen d'une série allélique comportant un allèle hypomorphe, l'allèle *néo* (Gage et al., 1999). Les souris homozygotes pour cet allèle peuvent vivre jusqu'au jour postnatal 1 (P1), permettant l'étude du rôle de *Pitx2* après e14,5. Le rôle de *Pitx2* a aussi été investigué par le remplacement de la séquence codante pour

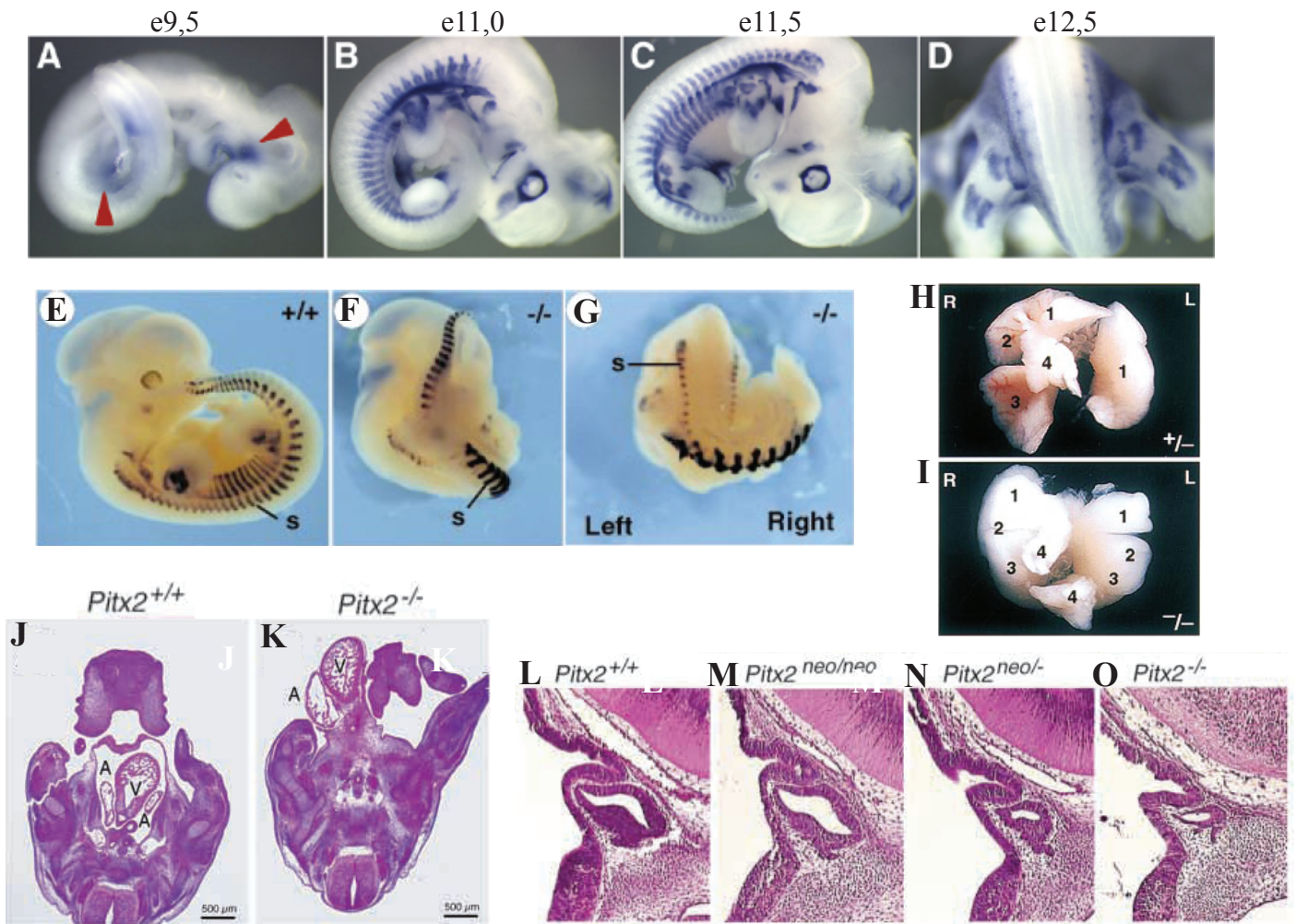


Figure 1.2. Profil d'expression de *Pitx2* et phénotype des souris *Pitx2*^{-/-}. (A-D) Profil d'expression de *Pitx2* par hybridation *in situ* sur embryons entiers à e9,5 (A), e11,0 (B), e11,5 (C) et e12,5 (D). *Pitx2* est exprimé à e9,5 dans l'ectoderme oral et le mésoderme de la lame latérale (A, flèches rouges). Adapté de L'Honoré et al., 2007. (E-G) Hybridation *in situ* contre la myogénine, exprimé dans le myotome, montrant le défaut de rotation des embryons *Pitx2*^{-/-}. (E-F) Vues latérales, (G) Vue postérieure. s : somites. Adapté de Lu et al., 1999. (H-I) Isomérisme pulmonaire droit chez *Pitx2*^{-/-}. R : droit, L : gauche. Adapté de Lu et al., 1999. (J-K) Coupes histologiques transversales au niveau du coeur d'embryons à e12,5. Les embryons *Pitx2*^{-/-} meurent vers e14,5 de défauts cardiaques, accompagnés de l'éviscération des organes internes. A : atrium, V : ventricule. Adapté de Gage et al., 1999. (L-O) Coupes histologiques sagittales à e12,5 montrant la réduction de la taille de la poche de Rathke avec la perte d'allèle fonctionnel de *Pitx2*. Adapté de Suh et al., 2002.

l'homéodomaine de la protéine par celle du gène *LacZ* (Kitamura et al., 1999; Lin et al., 1999). Dans tous les cas, l'importance de *Pitx2* au niveau des événements tardifs de la détermination de l'asymétrie gauche-droite est incontestable. L'expression asymétrique de *Pitx2c* au niveau du mésoderme de la lame latérale gauche semble être en aval d'une cascade génétique comprenant *Shh/Nodal/lefty2* et *Nkx2* (Shiratori et al., 2001; Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998; Meno et al., 1998). L'expression ectopique de *Pitx2* du côté droit du mésoderme de la lame latérale chez le poulet et la grenouille modifie le sens de rotation de l'embryon et l'enroulement du cœur et des intestins (Logan et al., 1998; Ryan et al., 1998; Campione et al., 1999; Yu et al., 2001; Linask et al., 2002). Les souris mutantes possédant des défauts de latéralité (par ex. la souris *iv (situs inversus viscerum)*) présentent aussi des modifications dans le patron d'expression de *Pitx2* (Piedra et al., 1998). Enfin, les embryons *Pitx2*^{-/-} montrent un isomérisme pulmonaire droit (voir **figure 1.2 H-I**, p. 34), un mauvais positionnement du cœur (voir **figure 1.2 J-K**, p. 34) ainsi qu'un défaut de rotation au niveau postérieur de l'embryon, laissant le bas du corps tourné vers la droite (voir **figure 1.2 E-G**, p.34) (Gage et al., 1999; Lin et al., 1999; Lu et al., 1999).

Les embryons *Pitx2*^{-/-} montrent un arrêt précoce du développement de l'hypophyse au stade de la poche de Rathke ainsi qu'un défaut de prolifération cellulaire (voir **figure 1.2 L-O**, p. 34) (Gage et al., 1999; Lin et al., 1999). Afin d'investiguer l'implication de *Pitx2* durant les étapes plus tardives du développement de l'hypophyse, l'allèle hypomorphe *Pitx2*^{néo} a été utilisé (Suh et al., 2002). L'étude de la série allélique en résultant a permis d'établir que *Pitx2* est nécessaire au maintien de l'expression des facteurs de transcription *Hesx1* et *Prop1*. À un stade

plus tardif, *Pitx2* est nécessaire à la spécification et l'expansion des cellules provenant de la lignée *Pit1* et des gonadotropes par l'activation de facteurs de transcription spécifiques. L'étude des doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2* a montré que les deux gènes ont un rôle à jouer dans l'expansion de la poche de Rathke, démontrant que le développement de l'hypophyse est sensible à un dosage global des *Pitx* (Suh et al., 2002).

Les embryons *Pitx2*^{-/-} présentent un phénotype développemental au niveau des dents, phénotype comparable à celui retrouvé dans l'hypophyse. En effet, les premières étapes de signalisation et de détermination sont engagées alors que l'émergence, la migration et l'expansion des différents types cellulaires font défaut à partir du stade des bourgeons de dents (Lu et al., 1999; Lin et al., 1999). Le développement des dents est arrêté au stade de bourgeons au niveau des dents de la mandibule et au stade de placodes au niveau des dents de la maxillaire (Lu et al., 1999; Lin et al., 1999). Au niveau de l'ectoderme oral, *Pitx2* régule positivement *Fgf8* tout en restreignant le domaine d'expression de *Bmp4* (Lu et al., 1999; Lin et al., 1999).

Les embryons *Pitx2*^{-/-} présentent aussi plusieurs défauts au niveau des yeux. Le segment antérieur de l'œil présente un épaissement de l'épithélium et du mésenchyme de la cornée alors que le segment postérieur montre un manque de muscles oculaires et un colobome du nerf optique (Kitamura et al., 1999).

Les spécificités des différents isoformes de *Pitx2* ont été explorées par manipulations génétiques. La double inactivation spécifique des isoformes a et b résulte en un défaut de fermeture du palais, une mauvaise rotation des intestins et des défauts oculaires (Liu et al., 2001). La création d'allèles délétant les deux isoformes a et b et encodant différents niveaux d'expression de l'isoforme c a pu démontrer que différents organes nécessitent différents niveaux d'expression de *Pitx2c* (Liu et al., 2001). En effet, alors que le développement du cœur ne requiert que de faibles concentrations de *Pitx2c*, le développement asymétrique des poumons et la rotation des intestins sont sensibles à une faible perte d'expression de *Pitx2c*. Ces différences de sensibilité aux différentes concentrations de l'isoforme c peuvent refléter des différences d'affinité entre *Pitx2c* et les séquences régulatrices des gènes cibles spécifiques aux organes en développement. Ou alors, il existerait des mécanismes de régulation limitant l'activité de *Pitx2c* dans certains organes. L'exemple de régulation transcriptionnelle par interaction protéine-protéine entre *Pitx2* et *Pit1* dans l'hypophyse (Amendt et al., 1998) laisse supposer la présence de co-facteurs capables de réguler l'activité de *Pitx2* de façon organe-spécifique.

1.3.1.4 *Pitx3*

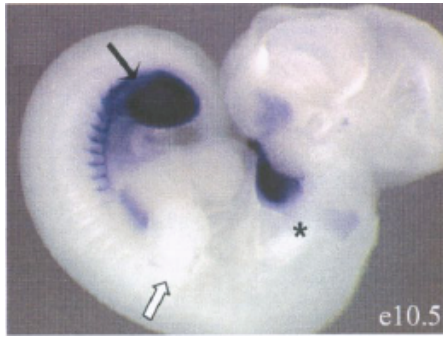
Le troisième membre de la famille, *Pitx3*, a été identifié par criblage d'une banque d'ADN complémentaire à l'aide d'une sonde comprenant la séquence codante pour l'homéodomaine de *Pitx2* ainsi que par homologie au gène *Pitx1* lors d'un criblage visant l'identification de gènes spécifiquement exprimés dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Semina et al., 1997; Smidt et al., 1997). *Pitx3* est

exprimé dans le cristallin de l'œil, le myotome et les muscles squelettiques différenciés, ainsi que dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Semina et al., 1997; van den Munckhof et al., 2003; L'Honoré et al., 2007; Smidt et al., 1997). La souris *aphakia* (*ak*) possède deux délétions dans le locus de *Pitx3* : une de 625pb située à 2,5 kb en amont de l'exon 1 (Semina et al., 2000) ; une autre beaucoup plus grande, incluant la région promotrice, l'exon et l'intron 1 (Rieger et al., 2001). En accord avec le patron d'expression de *Pitx3*, la souris *ak* présente une microphthalmie bilatérale en raison d'un arrêt de développement de la lentille de l'œil ainsi qu'une absence de neurones dopaminergiques de la substance noire, ce qui implique *Pitx3* dans la détermination ou le maintien de ces neurones (Smidt et al., 2004; Nunes et al., 2003; van den Munckhof et al., 2003). Ainsi, la souris *ak* représente un modèle pour la maladie de Parkinson, causée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques (van den Munckhof et al., 2003). De plus, il a été démontré que *Pitx3* est responsable de l'activation de la transcription de la tyrosine hydroxylase (TH), une enzyme participant à la biosynthèse de la dopamine, spécifiquement exprimée lors de la différenciation des neurones dopaminergiques (Maxwell et al., 2005; Lebel et al., 2001). La souris *ak* ne possède aucun phénotype musculaire. Un promoteur et un exon 1 alternatifs, situés entre l'exon 1 et l'exon 2, qui contient l'ATG, ont été identifiés comme étant responsables de l'expression de *Pitx3* au niveau musculaire chez la souris *ak* (Coulon et al., 2007).

1.3.1.5 *Pitx1* et l'identité des membres postérieurs

L'inactivation de *Pitx1* chez la souris a été réalisée afin d'investiguer son rôle dans les processus développementaux (Lanctôt et al., 1999). Le développement des embryons *Pitx1*^{-/-} semble être normal jusqu'à e12,5, c'est-à-dire que l'allantois et le stomodeum ne sont pas affectés. Cette absence de phénotype peut être attribuable à la compensation par un autre membre de la famille, *Pitx2*, lui aussi exprimé dans ces tissus. De la même façon, la formation de la poche de Rathke n'est pas affectée par la perte de *Pitx1*, suggérant que *Pitx1* n'est pas essentiel aux premières étapes de formation de l'hypophyse ou que la présence de *Pitx2* est capable de compenser la perte de *Pitx1* (Suh et al., 2002). Par contre, la déficience en *Pitx1* résulte en une réduction de la mandibule (micrognathia) et une transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs, confirmant le rôle de *Pitx1* dans la détermination des membres postérieurs (voir **figure 1.3 B-G**, p. 40) (Lanctôt et al., 1999; Szeto et al., 1999). La ceinture pelvienne est affectée : l'ischium et l'os pubique sont normaux, mais plus petits alors que l'ilion est absent (voir **figure 1.3 D**, p. 40). Ainsi, le bassin rejoint la colonne vertébrale à la première vertèbre sacrale (S1) via l'acétabulum plutôt que via la tête de l'ilion (voir **figure 1.3 E**, p. 40). Au niveau des membres, le fémur est réduit en taille, d'une façon plus prononcée du côté droit (voir **figure 1.3 F**, p. 40). Il y a une absence de rotule dans l'articulation du genou et les cartilages aux extrémités du fémur et du tibia sont réduits (voir **figure 1.3 G**, p. 40), ce qui transforme l'articulation qui ressemble alors à l'articulation du coude. Le tibia est aussi réduit en taille et en diamètre, rejoignant ainsi la taille du péroné. Cette

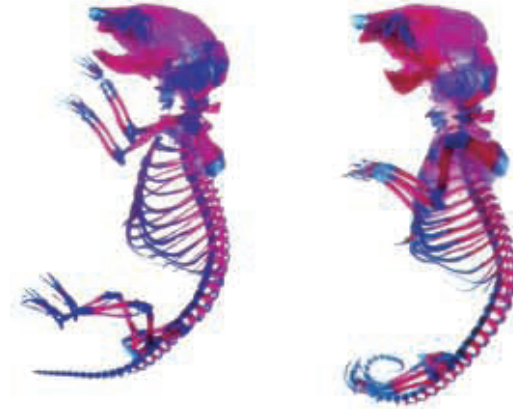
A



B

Pitx1^{+/+} ou +/-*Pitx1*^{-/-}

40



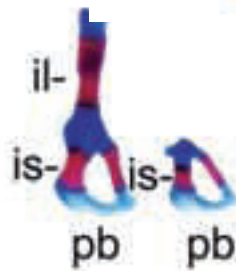
C

Membre antérieur

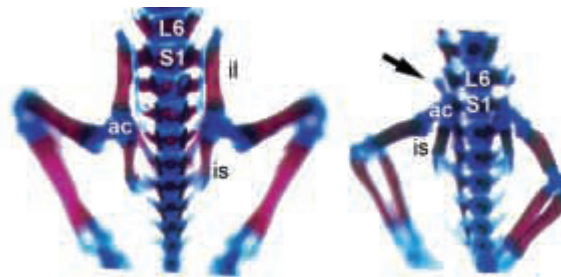
Membre postérieur

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

D

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

E

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

F

Fémur

droit

gauche

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

G

Genou

Coude

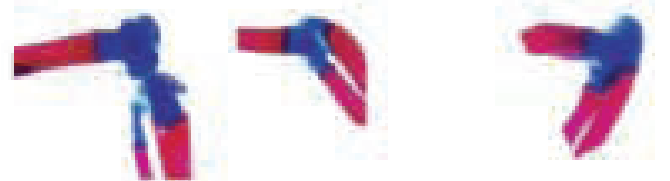
Pitx1^{+/+}*Pitx1*^{-/-}

Figure 1.3. Profil d'expression de *Pitx1* et phénotype des souris *Pitx1*^{-/-}. (A) Hybridation *in situ* sur embryons entiers présentant le profil d'expression de *Pitx1* à e10,5. *Pitx1* possède un domaine d'expression antérieur, au niveau du mésenchyme de la première arche branchiale et de l'ectoderme oral (étoile), et un domaine d'expression postérieur, spécifique au mésoderme de la lame latérale et du bourgeon de membre postérieur (flèche noire) tandis qu'il est absent du bourgeon de membre antérieur (flèche blanche). (A. Marcil, non-publié). (B-G) Coloration au rouge d'Alizarin et au bleu d'alcan de *Pitx1*^{+/+} et *Pitx1*^{-/-} à e17,5. *Pitx1*^{-/-} présente une hypoplasie de la mandibule (B) et une transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs (C) caractérisée par la perte de l'ilium (D) accompagnée d'un attachement à la colonne vertébrale via l'acétabulum plutôt que par l'ilium (E), la similitude de taille entre le tibia et le fibula qui rappelle la similitude entre le radius et l'ulna (E), la réduction de la taille du fémur, plus prononcée du côté droit (F) et l'absence de cartilage au niveau du genou, qui ressemble alors à une articulation telle que le coude (G). (Figures tirées de Lanctôt et al., 1999).

comparaison en taille des deux os formant le zeugopode rappelle la similitude entre le cubitus et le radius du membre antérieur (voir **figure 1.3 C**, p. 40). Au niveau de l'autopode, le calcanéum est réduit en taille. On retrouve aussi une formation osseuse qui ressemble au pisiforme, normalement retrouvé à l'intérieur de la main (Szeto et al., 1999). L'ensemble de ces phénotypes suggère que les membres postérieurs de *Pitx1*^{-/-} sont partiellement transformés en membres antérieurs. Au niveau moléculaire, seule l'expression de *Tbx4*, le seul autre gène connu pour être spécifiquement exprimé dans le mésenchyme du bourgeon de membre postérieur, est diminuée chez *Pitx1*^{-/-} (Lanctôt et al., 1999), suggérant que *Tbx4* est un gène cible de *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur en développement. Des expériences de sur-expression chez le poulet ont aussi démontré un rôle de *Pitx1* dans la détermination de l'identité postérieure des membres. Les membres antérieurs sur-exprimant *Pitx1* sont transformés morphologiquement vers une identité plus postérieure. L'articulation ressemble plus à celle du genou, les doigts ressemblent à des doigts de pied autant dans la forme que la taille et le patron musculaire est semblable à celui du membre postérieur (Logan and Tabin, 1999; Szeto et al., 1999). Au niveau moléculaire, on observe l'induction ectopique de *Tbx4*, *HoxC10* et *HoxC11*, normalement restreints aux membres postérieurs, suite à la sur-expression de *Pitx1* dans les membres antérieurs (Logan and Tabin, 1999; Szeto et al., 1999). Toutefois, lors de l'inactivation de *Pitx1* chez la souris, l'expression de *HoxC10* et de *HoxC11* demeure inchangée (Marcil et al., 2003).

1.3.1.6 Activité redondante de *Pitx1* et *Pitx2* dans le développement des membres postérieurs

En plus de *Pitx1*, un rôle de *Pitx2* a aussi été démontré lors du développement des membres postérieurs. Les souris déficientes en *Pitx1* montrent un phénotype asymétrique gauche/droite du développement des membres postérieurs (Lanctôt et al., 1999). La croissance du fémur est souvent plus affectée du côté droit (voir **figure 1.3 F**, p. 40), la perte du doigt #1 est exclusive au membre postérieur droit et lorsqu'il y a un déplacement postérieur de l'articulation entre l'acétabulum et les vertèbres sacrales, ce déplacement est parfois asymétrique et plus prononcé du côté droit. Ce phénotype asymétrique et l'expression préférentielle de *Pitx2c* du côté gauche du mésoderme de la lame latérale ont permis de poser l'hypothèse selon laquelle il y a compensation du phénotype du côté gauche par un rôle de *Pitx2* chez la souris *Pitx1*^{-/-}. Les embryons doubles mutants pour *Pitx1* et pour *Pitx2* ont été générés au laboratoire avec les souris portant soit l'allèle délété (*Pitx2*^{null}), soit l'allèle hypomorphe de *Pitx2* (*Pitx2*^{néo}) (Marcil et al., 2003). Les souris doubles hétérozygotes ont été difficiles à obtenir, n'atteignant pas les ratios mendéliens de 25 % attendus. En effet, les croisements entre *Pitx1*^{+/-} et *Pitx2*^{+/^{néo} n'ont généré que 20 % de souris *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/^{néo} et les croisements entre *Pitx1*^{+/-} et *Pitx2*^{+/-} n'ont généré que 2 % de *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/-}. Les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} ont donc été générés par croisement entre *Pitx1*^{+/-} et *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/-}. Quelques embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/-} ont été obtenus en croisant les doubles hétérozygotes porteurs de chaque allèle ensemble et un seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} a été obtenu lors de cette étude (Marcil et al., 2003). L'étude de ces embryons a montré un rôle}}

coopératif de *Pitx1* et de *Pitx2* quant au développement des membres postérieurs. En effet, les souris *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} montrent, tout comme les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}, un phénotype de croissance de pénétrance variable, selon la séquence suivante : la perte du doigt #1 du côté droit, puis la perte du tibia et la réduction du fémur du côté droit, ensuite la perte du doigt #1, puis du tibia du côté gauche (voir **figure 1.4 A-J**, p. 44). L'analyse du développement des bourgeons de membres postérieurs des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} a démontré une réduction de la taille des bourgeons, autant dans l'axe A/P que dans l'axe P/D (voir **figure 1.4 K**, p. 44). Cette réduction est plus prononcée du côté droit chez 50 % des embryons observés. Cette observation est donc en accord avec l'hypothèse d'un rôle conjoint de *Pitx1* et de *Pitx2* dans la croissance du mésoderme de la lame latérale à la hauteur du bourgeon de membre et du mésenchyme du bourgeon. L'analyse de l'expression de marqueurs moléculaires du développement des bourgeons de membres n'a pu révéler de changements marquants. En fait, une baisse d'expression de *Tbx4*, un marqueur des bourgeons postérieurs connu pour avoir une expression plus faible lors de l'inactivation de *Pitx1*, a été observée. La réduction de la taille du bourgeon selon l'axe A/P a été attribuée à une absence de mésenchyme antérieur. À l'aide de marqueurs de mésenchyme postérieur (*HoxC11*, *dHand*), on a pu constater que la proportion de mésenchyme postérieur par rapport à la taille du bourgeon selon l'axe A/P augmente avec la perte de *Pitx2* (voir **figure 1.4 K, O**, p. 44). De plus, on a observé que l'expression de *Shh* et de *Fgf4* s'étendait du côté antérieur du bourgeon des embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (voir **figure 1.4 L-M**, p. 44). L'étude de l'induction des marqueurs de croissance lors de l'émergence du bourgeon a révélé un retard de

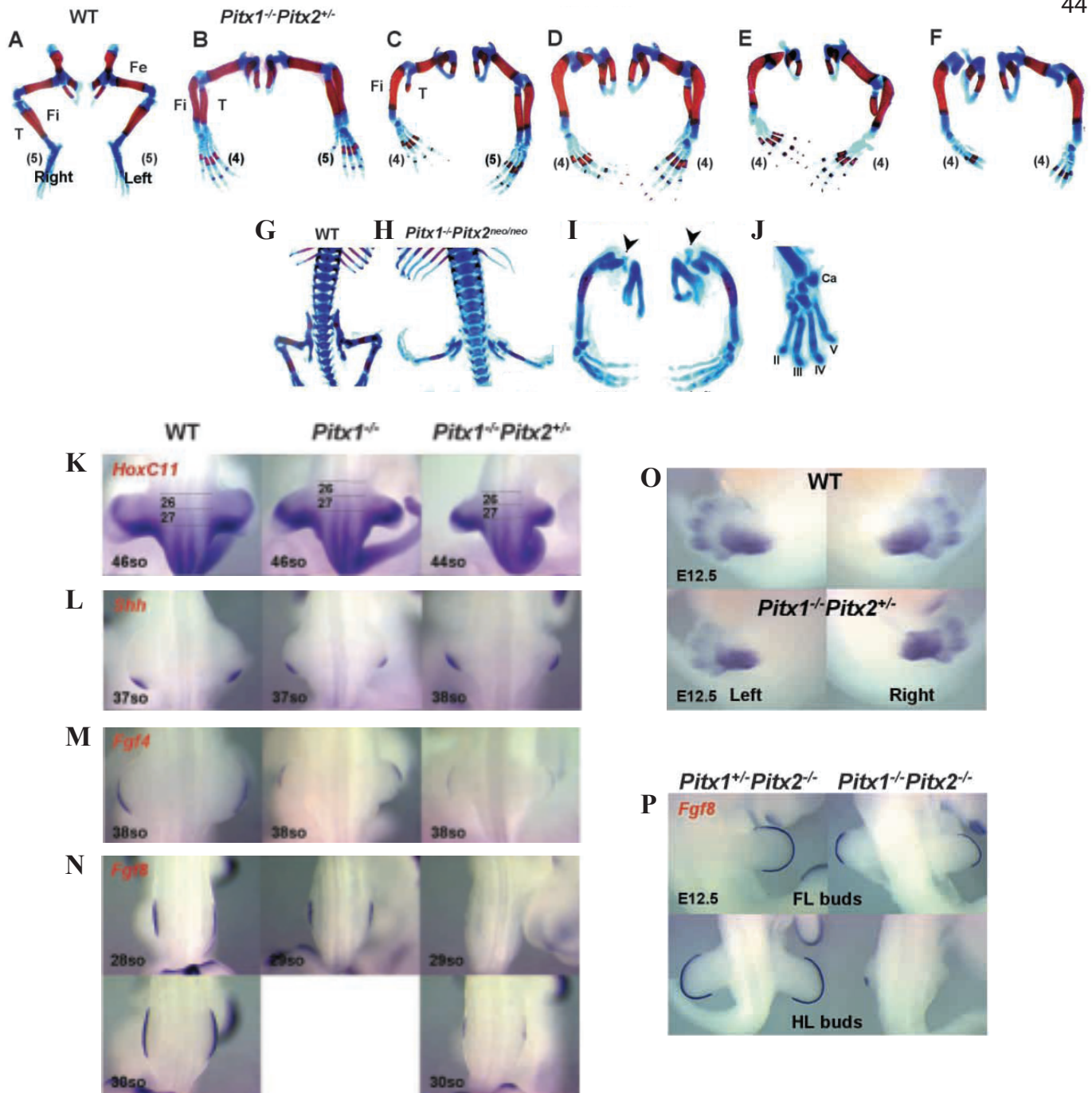


Figure 1.4. Phénotype des souris *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. (A-I) Coloration au rouge d'Alizarin et au bleu d'alcanin des membres postérieurs d'embryons sauvages (A, G), *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (B-F) et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} (H-I) montrant la pénétrance variable du phénotype chez *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} allant de la perte du doigt #1 du membre droit (B), l'hypoplasie du tibia du membre droit (C), la perte du tibia et l'hypoplasie du fémur droits ainsi que la perte du doigt #1 gauche (D), l'hypoplasie du tibia gauche (E) et l'hypoplasie du fémur gauche (F). Les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} montre la même séquence de phénotype variable. Les cas les plus sévères montrent la perte des doigts #1, des tibias et des fémurs (H-J). (K-P) Vues dorsales d'hybridations *in situ* sur embryons entiers. Croissance d'un bourgeon de membre postérieur plus petit, caractérisé par la perte de mésenchyme antérieur, montré par un marquage *HoxC11* (K), *Shh* (L) et *dHand* (O). Baisse de l'expression de *Fgf4* (M) et retard d'induction de *Fgf8* (N), passant du stade 28 somites chez l'embryon sauvage au stade de 30 somites chez *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}. Le seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu montre un important retard de croissance des bourgeons de membres postérieurs ainsi qu'une très faible expression de *Fgf8* dans l'AER (P). Figures tirées de A. Marcil, 2003.

l'induction de *Fgf8* au niveau de l'AER. Alors que l'induction de *Fgf8* se produit au stade de 27 somites chez l'embryon sauvage et chez *Pitx1*^{-/-}, elle n'arrive qu'au stade de 30 somites chez *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} (voir **figure 1.4 N**, p. 44). Chez le seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} obtenu, le bourgeon de gauche à e12,5 montre une très faible expression de *Fgf8* au niveau de l'AER et il y a une complète absence d'expression au niveau du bourgeon de droite (voir **figure 1.4 P**, p. 44). Ainsi, sans qu'il y ait de changements majeurs d'expression des marqueurs du patterning, autant selon l'axe P/D (*Meis1*, *Meis2*) que l'axe A/P (*Gli3*, *Shh*, *dHand*), la perte d'éléments squelettiques chez les embryons mutants pour *Pitx1* et *Pitx2* est attribuable à un retard d'induction des marqueurs de croissance au niveau de l'AER (Marcil et al., 2003).

1.3.2 La famille des gènes *Tbx*

La sous-famille des facteurs de transcription *Tbx* appartient à la famille des protéines à boîte T et comprend les gènes *Tbx2/4* et *Tbx3/5* résultant de la dispersion d'une duplication ancestrale en tandem. Chez la souris, *Tbx2/4* sont sur le chromosome 11 alors que *Tbx3/5* sont sur le chromosome 5 (Agulnik et al., 1996; Ruvinsky and Silver, 1997). Plusieurs mutations retrouvées dans les gènes appartenant à la sous-famille des *Tbx* ont été identifiées comme causant des syndromes humains. Entre autres, la mutation de *Tbx5* est connue pour être impliquée dans le syndrome Holt-Oram (HOS) caractérisé par de sévères malformations cardiaques accompagnées de malformations des membres antérieurs (perte du doigt #1 en plus d'une diminution de la taille du radius) (Basson et al., 1997; Li et al., 1997). Une mutation ponctuelle dans la région codante de *Tbx4* cause chez

l'humain le syndrome coxo-podo-patellaire («small patella syndrome»), défini par une absence ou une hypoplasie de la rotule, des malformations de la ceinture pelvienne et du fémur et l'agrandissement de l'espace entre le doigt #1 et #2 tandis que la taille des doigts #4 et #5 est amoindrie (Bongers et al., 2004).

1.3.2.1 Rôles de *Tbx4* et *Tbx5* dans la croissance des membres

1.3.2.1.1 *Tbx5* et la croissance des membres antérieurs

Lors du développement embryonnaire, *Tbx5* est exprimé dans le cœur et dans le territoire présomptif des membres antérieurs au niveau du flanc avant le bourgeonnement (Chapman et al., 1996; Li et al., 1997). L'inactivation de *Tbx5* chez la souris a révélé son rôle essentiel pour la croissance des bourgeons de membres (Agarwal et al., 2003). Puisque l'inactivation de *Tbx5* est létale à e10,5 à cause d'anomalies cardiaques, la souris *Prx1-Cre;Tbx5* a été développée, le transgène *Prx1-Cre* dirigeant l'expression de la Cre seulement dans le mésenchyme des bourgeons de membres (Logan et al., 2002; Rallis et al., 2003). Cette souris a démontré l'importance de *Tbx5* dans la croissance du bourgeon de membre antérieur puisque celle-ci ne développe aucune structure osseuse, pas même celle de la jonction articulaire de l'épaule (Rallis et al., 2003). De plus, la sur-expression d'un dominant négatif de *Tbx5* dans le territoire présomptif des membres antérieurs abroge la formation de ceux-ci (Takeuchi et al., 2003). Au contraire, la sur-expression de *Tbx5* dans le flanc résulte en la croissance d'un membre ectopique (Takeuchi et al., 2003). Plusieurs études ont montré que *Tbx5* possède un rôle essentiel dans l'initiation de

l'expression de *Fgf10* dans le territoire présomptif des membres antérieurs (Agarwal et al., 2003; Rallis et al., 2003). Le promoteur de *Fgf10* contient des sites consensus de liaison des facteurs à boîte T capables de répondre à ceux-ci en transfection transitoire, ce qui suggère une régulation directe de *Fgf10* par *Tbx5* (Agarwal et al., 2003; Ng et al., 2002). Comme le promoteur de *Fgf10* contient aussi des éléments de réponse pour Lef1 et Tcf1, il est envisageable que *Tbx5* interagisse avec la voie de signalisation des Wnts pour initier l'expression de *Fgf10* et activer la croissance du bourgeon de membre antérieur (Agarwal et al., 2003; Garrity et al., 2002; Ng et al., 2002; Rallis et al., 2003; Takeuchi et al., 2003). Enfin, il a été démontré que *Tbx5* interagit avec *Sall4* dans l'activation de *Fgf10* dans le bourgeon de membre antérieur (Koshiba-Takeuchi et al., 2006). L'expression de *Fgf10* est grandement réduite, principalement dans la région antérieure du bourgeon, lors de l'inactivation d'un allèle de *Tbx5* et d'un allèle de *Sall4*. De plus, *Sall4* est capable de synergie activatrice avec *Tbx5* et *Tbx4* sur le promoteur de 7 kb de *Fgf10* en transfection. Tous ces résultats démontrent que *Tbx5* est en amont d'une cascade de régulation dirigeant la croissance du bourgeon de membre antérieur.

1.3.2.1.2 *Tbx4* et la croissance des membres postérieurs

Tbx4 est exprimé très tôt au cours du développement embryonnaire : dès e7,5 dans l'allantoïde, puis dans le mésenchyme de la mandibule ainsi que celui des poumons, dans la région du cœur qui donnera naissance à l'aorte et dans la paroi abdominale (Naiche and Papaioannou, 2003). De plus, l'expression de *Tbx4* est spécifique au mésenchyme des bourgeons de membres postérieurs. En fait,

l'expression de *Tbx4* au niveau des bourgeons de membres postérieurs semble être dirigée par *Pitx1*. Elle est plus tardive que celle de *Pitx1* et les embryons *Pitx1*^{-/-} ont une expression atténuée de *Tbx4* lors du développement des bourgeons (Chapman et al., 1996; Lanctôt et al., 1997; Szeto et al., 1999).

L'inactivation génétique de *Tbx4* chez la souris est létale à e10,5 en raison de défauts de la fusion chorioallantoïdienne, contrecarrant l'étude de la formation des membres postérieurs chez ces mutants (Naiche and Papaioannou, 2003). Les bourgeons des membres postérieurs des embryons *Tbx4*^{-/-} à e10,5 ont une taille normale, suggérant que *Tbx4* n'est pas impliqué dans l'initiation de la croissance du bourgeon de membre postérieur. De ce fait, l'expression de *Fgf8* au niveau de l'AER est intacte chez ces mutants, contrairement aux embryons *Tbx5*^{-/-}. L'expression de *Fgf10* est aussi normalement initiée chez *Tbx4*^{-/-}, mais sa maintenance est défailante (Naiche and Papaioannou, 2003). L'étude du développement des poumons a montré que l'expression ectopique de *Tbx4* était capable d'induire l'expression de *Fgf10* (Sakiyama et al., 2003). De plus, la sur-expression de *Tbx4* au niveau du flanc est suffisante pour la croissance d'un membre ectopique, suggérant l'activation de *Fgf10* (Takeuchi et al., 2003). Une régulation positive de *Fgf10* par *Tbx4* pourrait expliquer le fait que les bourgeons de membres postérieurs des embryons *Tbx4*^{-/-} montrent un déficit de croissance en culture (Naiche and Papaioannou, 2003).

L'étude du rôle de *Tbx4* dans la croissance du bourgeon de membre postérieur s'est poursuivie à l'aide de l'inactivation conditionnelle de *Tbx4* par les transgènes *Rosa-ERcre*^{T2} et *Prx1-Cre* (Logan et al., 2002; Naiche and Papaioannou, 2007). Le

transgène *Rosa-ERcre*^{T2} dirige l'expression de la Cre ubiquitairement suite à l'administration de tamoxifène (de Luca et al., 2005). Le transgène *Prx1-Cre* dirige quant à lui l'expression de la Cre exclusivement dans le mésenchyme des bourgeons de membres (Logan et al., 2002). L'étude des phénotypes résultants de l'inactivation de *Tbx4* à différents temps développementaux a montré le rôle primordial de *Tbx4* dans une courte fenêtre de temps, soit de l'initiation de la croissance jusqu'à e11,5, pour l'établissement d'une boucle de régulation entre *Fgf10* du mésenchyme et les *Fgfs* de l'AER. L'inactivation de *Tbx4* avant l'initiation de son expression dans le territoire présomptif des membres postérieurs est indiscernable de *Tbx4*^{-/-}, mais permet d'étudier les embryons plus tard au cours du développement. À partir de e10,0, *Fgf10* est faiblement exprimé dans le mésenchyme, tandis qu'on observe une expression sporadique de *Fgf8* dans l'AER. À partir de e10,5, les bourgeons perdent l'expression de *Fgf10*. À e11,5, ils perdent aussi l'expression de *Fgf8*, *Shh*, *dHand* et *Alx4*. Ainsi, la croissance du bourgeon est interrompue. L'expression précoce de *Tbx4* est par conséquent essentielle à la croissance du bourgeon et donc à la formation des membres postérieurs.

Lorsque *Tbx4* est inactivé après la formation du bourgeon, c'est-à-dire entre e10,5 et e12,5, on observe la formation d'un pubis et d'un péroné hypoplasiques, la fusion des doigts antérieurs et la perte complète du fémur, qui ne s'articule plus à la hanche. La présence des doigts de l'autopode argumente en défaveur d'un rôle de *Tbx4* dans la croissance du bourgeon après e10,5. L'utilisation du transgène *Prx1-Cre* mène à une forte atténuation, et non à une complète ablation, de l'expression de *Tbx4* dans le mésenchyme du bourgeon de membre postérieur. Toutefois, les

embryons *Prx1-Cre;Tbx4^{fllox/fllox}* phénotypent les embryons où l'expression de *Tbx4* a été abrogée à e10,5. L'étude du développement des bourgeons postérieurs de ces derniers a montré une réduction en taille selon l'axe A/P, où les marqueurs de mésenchyme postérieur (*Ptc*, *dHand*) occupent une plus grande proportion du bourgeon en raison de l'expansion du domaine de signalisation par *Shh*. Aussi, l'expression de *Fgf8* lorsque *Tbx4* est inactivé à e10,5 est tronquée dans le domaine antérieur de l'AER. Toutefois, tous les marqueurs de la signalisation par les Fgfs entre l'AER et le mésenchyme sous-jacents (*Fgf10*, *Fgfr1*, *Spry*) demeurent intacts, confirmant que *Tbx4* n'est pas essentiel, après e10,5, à la croissance du bourgeon.

De ces résultats, les auteurs concluent à un rôle coopératif de *Tbx4* et un autre facteur de transcription dans l'expression de *Fgf10* (Naiche and Papaioannou, 2007). *Tbx4* serait essentiel à un niveau d'expression adéquat de *Fgf10* lors de l'initiation de la croissance du bourgeon. Toutefois, lorsque la boucle d'autorégulation des Fgfs est établie, *Tbx4* et le facteur hypothétique auraient des rôles additifs de telle sorte que l'ablation de *Tbx4* après l'établissement de cette boucle ne produit qu'un phénotype hypomorphe de la signalisation par les Fgfs.

1.3.2.2 Rôles de *Tbx4* et *Tbx5* dans l'identité des membres

1.3.2.2.1 *Tbx5* et l'identité des membres antérieurs

Un rôle de *Tbx5* a aussi été suggéré dans la détermination de l'identité des membres antérieurs. La surexpression de *Tbx5* dans le bourgeon de membre

postérieur cause l'acquisition par les membres postérieurs de caractères antérieurs (Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Toutefois, les expériences de perte de fonction chez la souris ne permettent pas de confirmer ce rôle puisqu'aucun membre n'est formé en absence de *Tbx5*. De plus, la surexpression de *Tbx4* dans les membres antérieurs où l'expression de *Tbx5* a été supprimée suffit pour rétablir la formation de membres dont l'identité est antérieure (Minguillon et al., 2005). Ceci argumente en faveur d'un rôle équivalent des facteurs *Tbx4/5* dans la croissance des bourgeons de membre.

1.3.2.2 *Tbx4* et l'identité des membres postérieurs

De la même façon que *Pitx1*, l'expression ectopique de *Tbx4* dans le bourgeon de membre antérieur de poulet mène au développement de membres possédant des caractères propres aux membres postérieurs (Gibson-Brown et al., 1996; Gibson-Brown et al., 1998; Ohuchi et al., 1998; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Niswander, 1999). Ainsi, *Tbx4* a été impliqué dans la détermination de l'identité des membres postérieurs. Par contre, le remplacement de l'expression de *Tbx5* par *Tbx4* dans les bourgeons de membres antérieurs chez la souris ne cause pas de transformation de l'identité et ceux-ci se développent en membres antérieurs, signifiant que *Tbx4* n'est pas suffisant pour transformer l'identité des membres antérieurs chez la souris (Minguillon et al., 2005). De plus, l'inactivation de *Tbx4* à e10,5 avec le transgène *Rosa-ERcre*^{T2} ou avec *Prx1-Cre* ne transforme pas l'identité des membres postérieurs, autant par l'étude de leur morphologie que par l'expression de marqueurs moléculaire (*Pitx1*, *Hoxc9* et *Tbx4* lui-même, alors que l'expression de

Tbx5 est toujours exclue). Somme toute, un rôle de *Tbx4* dans l'identité des membres postérieurs est contestable.

1.4 La famille des gènes *Iroquois*

Les gènes de la famille Iroquois ont d'abord été identifiés chez la drosophile lors d'un crible réalisé dans le but d'identifier de nouveaux gènes participant au patterning des organes sensoriels externes (Leyns et al., 1996; Dambly-Chaudiere and Leyns, 1992). La drosophile possède trois gènes de la famille des Iroquois, codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine. Le complexe Iroquois (Iro-C), compris dans une région de 130 kb (Netter et al., 1998) contient ainsi les gènes *araucan* (*ara*), *caupolican* (*caup*) et *mirror* (*mirr*) (Gomez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997). *Ara* et *caup* sont tous deux exprimés dans les disques imaginaux et sont nécessaires à l'expression des gènes proneuraux du complexe *achaete-scute* (*ac-sc*), qui déterminent la position des organes sensoriels, et de *rhomboid*, qui organisent les veines des ailes (Gomez-Skarmeta et al., 1996). *Mirr* a été décrit comme participant au patterning dorso-ventral de l'œil en positionnant l'équateur (McNeill et al., 1997) ainsi que, en coopération avec *ara* et *caup*, au pré-patterning des cellules sensorielles (Kehl et al., 1998). Un site consensus de liaison des facteurs Iro de la drosophile (ACAnnTGT) a été identifié et transfère les activités de répresseurs transcriptionnels de ces facteurs *in vivo* (Bilioni et al., 2005).

Chez les vertébrés, plusieurs homologues des gènes du complexe Iro-C de la drosophile ont été décrits, chez des organismes aussi variés que le poisson-zèbre, le

xénope, le poulet, la souris et l'humain (Bosse et al., 1997; Bellefroid et al., 1998; Gomez-Skarmeta et al., 1998; Bao et al., 1999; Funayama et al., 1999; Goriely et al., 1999; Lewis et al., 1999; Tan et al., 1999; Bruneau et al., 2000).

Chez les mammifères, on retrouve six gènes de la famille des *Iroquois*, organisés en deux clusters ou groupes : IrxA (*Irx1*, *Irx2* et *Irx4*) situé sur le chromosome 13 de la souris et 5 de l'humain et IrxB (*Irx3*, *Irx5* et *Irx6*) sur le chromosome 8 de la souris et 16 de l'humain (voir **figure 1.5 A**, p. 54) (Peters et al., 2000). Pour ce qui est de leur séquence protéique, les gènes de la famille des *Iroquois* partagent un homéodomaine très conservé de la super-classe TALE (*three amino acid loop extension*) caractérisé par un résidu alanine en position 50 qui définit la spécificité de liaison à l'ADN (Treisman et al., 1989) ainsi qu'une boîte Iro de 13 acides aminés dans leur région C-terminale, possiblement impliquée dans des interactions protéines-protéines (voir **figure 1.5 B**, p. 54) (Burglin, 1997). En raison d'une forte conservation inter-espèces de l'homéodomaine des protéines Irx, le site consensus identifié chez la drosophile (ACAnnTGT) est capable de lier le facteur Irx4 de la souris, argumentant en faveur d'un site consensus universel (Bilioni et al., 2005). L'étude phylogénétique des *Irx* (Peters et al., 2000) montre que les six gènes des vertébrés forment des groupes distincts, représentant des orthologues qui ont dérivé d'un seul gène ancestral. Comme les trois gènes Iro-C de la drosophile forment une classe distincte par rapport aux *Irx* des vertébrés, il s'avère que la duplication des gènes s'est produite indépendamment chez les vertébrés et les invertébrés. Enfin, en plus de définir six classes de gènes orthologues, les *Irx* peuvent être ordonnés en trois classes de gènes paralogues (*Irx1* ~ *Irx3*, *Irx2* ~ *Irx5* et

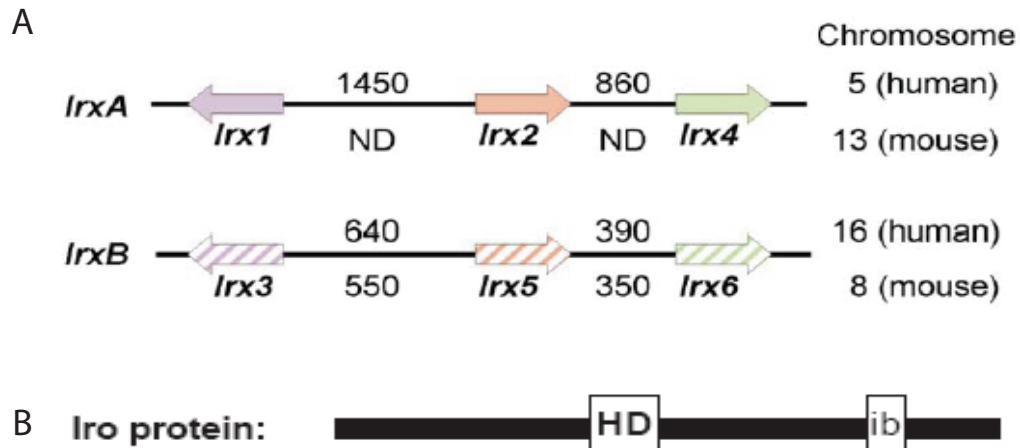


Figure 1.5. Organisation génomique des gènes *Iroquois* et schématisation de la protéine Iro.

(A) Schématisation de l'organisation génomique des deux clusters *Irx* des mammifères, localisés sur les chromosomes 13 et 8 chez la souris, et 5 et 16 chez l'humain. La distance entre les séquences géniques est donnée en kb. ND, non-déterminé. (Figure tirée de Houweling et al., 2001). (B) Schématisation de la protéine Iro. Toutes les protéines Iro contiennent deux motifs très conservés : l'homéodomaine de la super-classe TALE (HD) et la boîte Iro (ib). (Figure tirée de Cavodeassi et al., 2001).

Irx4 ~ Irx6) générés à partir d'un événement de duplication. L'organisation génomique en clusters démontre une pression sélective envers les régions intergéniques, contenant des éléments de régulation transcriptionnelle partagés entre les gènes d'un même cluster (Peters et al., 2000).

Chez les vertébrés, les patrons d'expression de *Irx1/2* ainsi que *Irx3/5* sont hautement semblables, présents dans le cœur, le cerveau, le tube neural, le mésenchyme de la tête et du corps, le cartilage des côtes et les membres, alors que ceux de *Irx4/6* divergent légèrement (Houweling et al., 2001; Bosse et al., 1997; Bosse et al., 2000; Bruneau et al., 2000; Christoffels et al., 2000; Cohen et al., 2000; Mummenhoff et al., 2001).

1.4.1 Cluster *IrxA*

L'expression de *Irx1* débute dès e7,5 dans le mésoderme pré-chordal alors que l'expression de *Irx2* débute à e8,5 dans le rhombencéphale et celle de *Irx4* dès e7 dans le chorion, e7,5 dans le croissant cardiaque et à partir de e8,5 dans le rhombencéphale. Lors du développement du système nerveux, *Irx1/2* présentent des patrons très semblables au niveau du mésencéphale, du cervelet, de la moelle épinière et du thalamus. À e9,5, *Irx1/2* sont présents dans les vésicules optiques, formant un patron complémentaire à *Irx3/5*. *Irx2/4* sont présents dans tout l'épiderme de l'embryon alors qu'*Irx1* est faiblement présent dans l'épiderme du corps. *Irx1/2* sont exprimés dans le primordium des dents et plus fortement dans le mésoderme adjacent à l'endoderme du sillon laryngo-tracheal. *Irx1/2* présentent des patrons identiques au

niveau du cœur en développement, restreints au segment ventriculaire qui inclut le septum, alors qu'*Irx4* est exprimé dans le myocarde. À partir de e10,5, *Irx1/2* sont présents dans les somites, confinés à la région qui donnera naissance aux côtes. Au niveau des membres en développement, *Irx1/2* sont détectés dès e10,5, dans la région proximo-antérieure du bourgeon (voir **figure 1.6 A**, p. 57). À e11,5, leur expression est restreinte aux régions pré-cartilagineuses des doigts en formation et à e13,5, elle est confinée à trois bandes, qui correspondent aux jointures en formation, par comparaison avec l'expression de *Gdf5*. *Irx4* n'est jamais exprimé dans le membre en développement.

1.4.2 Cluster *IxrB*

L'expression de *Irx3* débute très tôt, dès e6,5 dans la partie extra-embryonnaire du cylindre de l'œuf, structures dérivant du trophoctoderme, et, dans l'embryon, dès e7,5 dans l'ectoderme de la plaque neurale. À e8,0, *Irx3/5* sont exprimés dans l'épithélium neural de la tête et dans le mésoderme de la lame latérale. L'expression de *Irx6* débute à e10,5 dans l'endocarde. Au niveau du système nerveux, *Irx3/5* sont retrouvés dans la région dorso-latérale du mésencéphale et dans la région ventro-latérale du métencéphale. Au niveau de la moelle épinière, tous les gènes du cluster B sont exprimés dans la zone ventriculaire et dans les neurones moteurs. *Irx3/5* sont de plus exprimés dans les régions latérales du tube neural et dans la notochorde. *Irx3/5/6* sont présents dans le primordium de la glande mammaire, alors que les gènes du cluster A y sont absents. De plus, *Irx3/5* sont présents dans l'endoderme de l'intestin antérieur alors que *Irx1/2* y sont présent dans

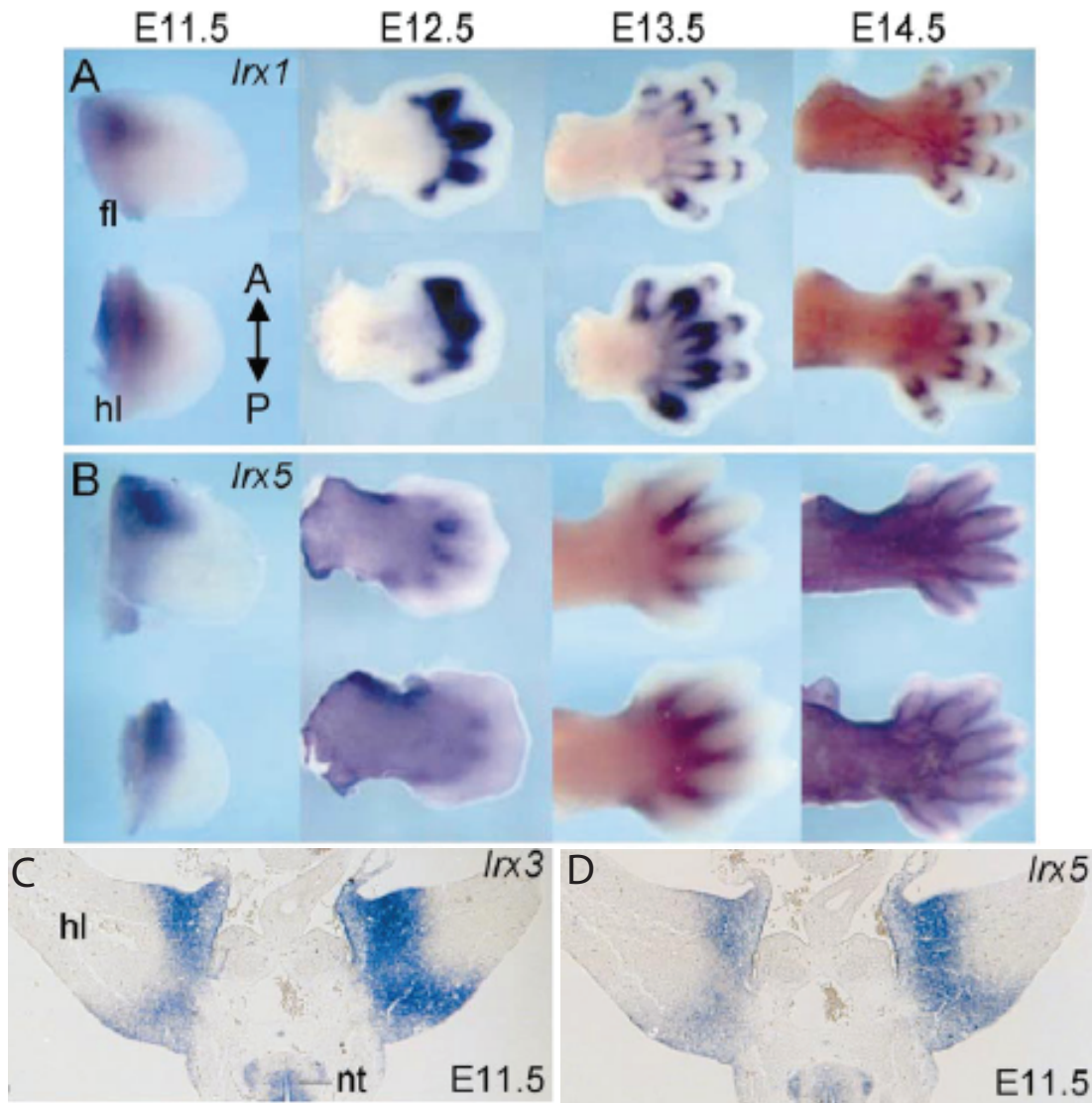


Figure 1.6. Patron d'expression des gènes *Irx* lors du développement des membres par hybridation *in situ* sur embryons entier (A-B) et sur coupes transversales (C-D) aux âges indiqués. (A) Patron d'expression de *Irx1*, semblable à celui d'*Irx2*. (B) Patron d'expression de *Irx5*, représentatif de celui de *Irx3*, et, à partir de e12,5, de celui de *Irx6*. (C) Hybridation *in situ* sur coupes transversales suggérant une co-expression de *Irx3* et *Irx5* dans la région proximale du bourgeon de membre en développement. (Figure tirée de Houweling et al., 2001).

le mésoderme. Au contraire, *Irx4/6* sont absents de cette région. Tout comme *Irx1/2*, *Irx3/5* sont fortement exprimés dans la couche épithéliale des poumons et des bronches. Au niveau du cœur, *Irx3* est exprimé dans les trabéculations des ventricules et *Irx5/6* sont exprimés dans la couche endocardique des chambres atriale et ventriculaire (Mummenhoff et al., 2001). *Irx3/5* sont aussi présents dans les gonades ainsi que dans des patrons similaires au niveau des précondensations de la capsule otique et de l'endoderme de l'estomac. Lors du développement des membres, les gènes du cluster B présentent des patrons similaires, bien que *Irx6* soit moins fortement exprimé. Ils sont présents dès l'apparition des bourgeons, dans la région proximale, plus fortement du côté dorsal et antérieur (voir **figure 1.6 B, C**, p. 57). À e13,5, leur expression est confinée au mésenchyme de la région interdigitale (voir **figure 1.6 B**, p. 57).

L'étude spatio-temporelle des patrons d'expression des *Irx* démontre une similitude entre gènes d'un même cluster. À partir de e9,5, *Irx1/2* et *Irx3/5* possèdent des patrons d'expression semblables dans la majorité des organes. En plus de la conservation des régions intergéniques des clusters, l'étude des patrons d'expression suggère la présence d'éléments de régulation transcriptionnelle dans les régions intergéniques influençant la transcription des gènes d'un même cluster.

1.4.3 *Irx3* et *Irx5* dans le développement des membres

Récemment, l'inactivation du gène *Irx3* par insertion du gène *LacZ*, ainsi que celle du gène *Irx5* par insertion du gène codant pour la GFP, ont été produites (C. C.

Hui, comm. pers.). L'analyse des mutants générés, ainsi que celle des doubles mutants, a démontré un rôle redondant entre *Irx3* et *Irx5* quant au développement de l'omoplate, de la hanche ainsi que des membres postérieurs (voir **figure 1.7**, p. 60). Bien que les simples mutants *Irx3*^{-/-} et *Irx5*^{-/-} ne présentent aucun phénotype, le développement de l'omoplate et de la hanche est compromis lorsque trois allèles sur quatre des gènes *Irx3* et *Irx5* sont mutés. Le phénotype est encore plus prononcé lors de l'absence des deux allèles de *Irx5* (voir **figure 1.7 B**, p. 60). Pour ce qui est du développement des membres, les membres antérieurs des doubles mutants *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} sont peu affectés, montrant une faible hypoplasie de la région proximale de l'humérus. Leurs membres postérieurs sont en revanche sérieusement affectés (voir **figure 1.7 B**, p. 60). Les membres postérieurs de *Irx3*^{+/-};*Irx5*^{-/-} sont hypoplasiques et ceux de *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} présentent une perte des éléments squelettiques antérieurs : un fémur très aminci, une absence de tibia et du doigt #1. De plus, la moitié des embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} montrent aussi une absence du doigt #2. Les régions du membre qui sont affectées correspondent donc au profil d'expression des gènes *Iroquois* dans le bourgeon, c'est-à-dire au niveau proximal, confiné à la partie antérieure. L'analyse de l'expression de marqueurs moléculaires présents lors du développement des membres a montré la perte de l'expression de *Pax1* et de *Pax9* exclusivement au niveau des bourgeons de membres postérieurs (voir **figure 1.8**, p. 61) (C. C. Hui, comm. pers.). Leur expression demeure inchangée au niveau des bourgeons de membres antérieurs, bien que celle de *Pax1* soit légèrement atténuée. En somme, les embryons doubles mutants pour *Irx3* et *Irx5* (voir **figure 1.7**, p. 60) présentent un phénotype semblable aux embryons doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2* (voir **figure 1.4**, p. 44), c'est-à-dire un phénotype de croissance des bourgeons

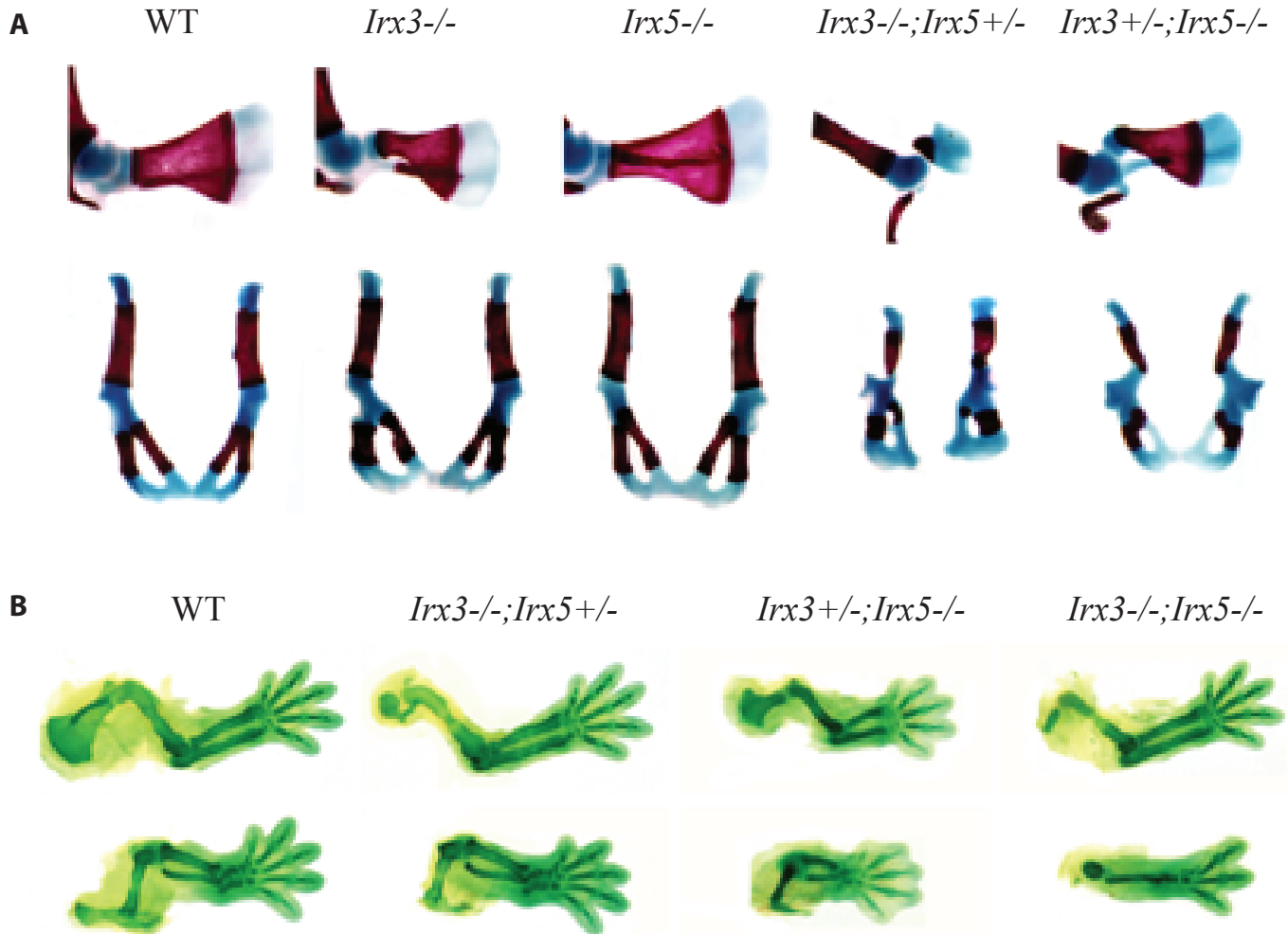


Figure 1.7. Implication de *Irx3* et *Irx5* dans le développement de l'omoplate, de la hanche et des membres postérieurs. (A) Coloration au rouge Alizarin et au bleu alcian de squelettes à e18,5 montrant que *Irx3* et *Irx5* jouent des rôles redondants lors du développement de l'omoplate et de la hanche. Alors qu'on observe la formation d'une omoplate et d'une hanche normales chez les mutants *Irx3*^{-/-} et *Irx5*^{-/-}, l'omoplate est faiblement affectée chez *Irx3*^{+/-};*Irx5*^{-/-} et sévèrement hypoplasique chez *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{+/-}. (B) Coloration au bleu alcian de squelettes cartilagineux à e14,5 montrant de sévères défauts de formation de l'omoplate et de la hanche chez *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-}. Alors que les membres antérieurs de *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} ne sont pas affectés, les membres postérieurs présentent de sévères défauts, incluant l'amincissement du fémur, l'absence de tibia et du doigt #1. 50 % des embryons montrent aussi l'absence du doigt #2. (Avec permission de C. C. Hui, Université de Toronto, résultats non-publiés).

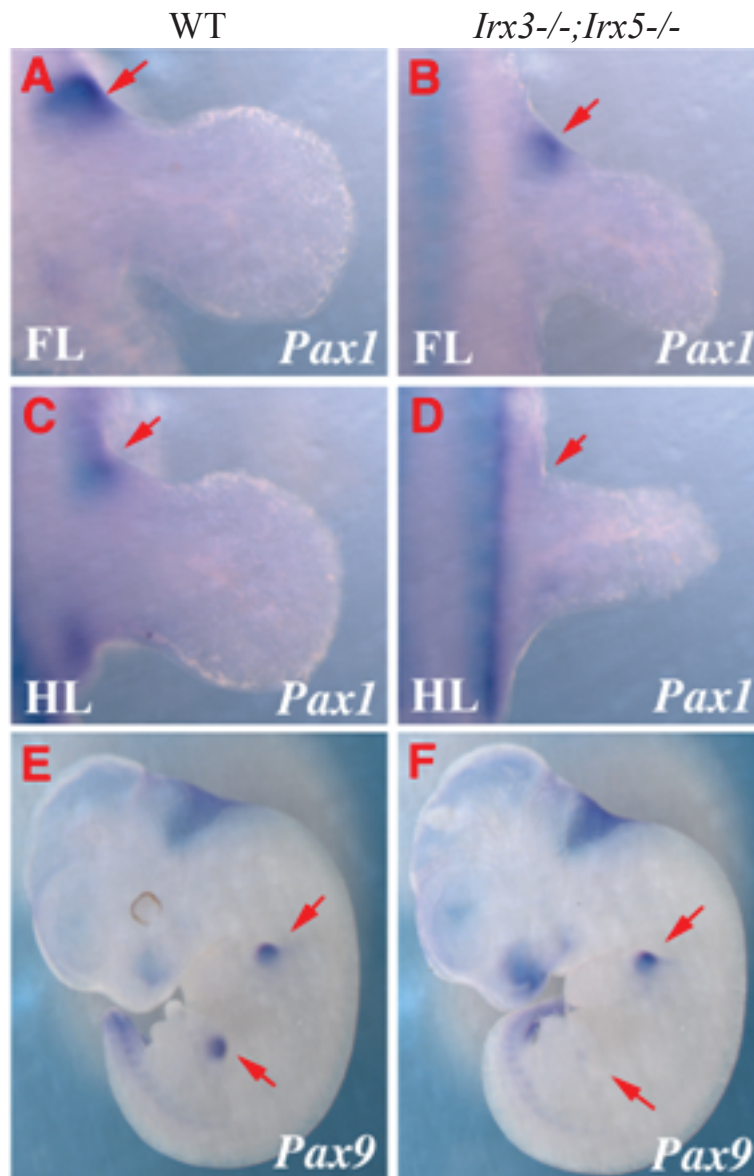


Figure 1.8. Perte d'expression de *Pax1* et de *Pax9* au niveau des bourgeons de membres postérieurs des embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-}. Hybridation *in situ* sur embryons entiers montrant l'expression de *Pax1* au niveau des bourgeons de membres antérieurs (A, B) et postérieurs (C, D) chez l'embryon sauvage (A, C) et *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (B, D) ainsi que l'expression de *Pax9* chez l'embryon sauvage (E) et *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} à e11,5. FL : forelimb ou membre antérieur. HL : hindlimb ou membre postérieur. (Avec permission de C. C. Hui, Université de Toronto, résultats non-publiés)

de membres postérieurs allant jusqu'à la perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs des membres postérieurs, soit le fémur, le tibia et le doigt #1.

1.5 *Pax1* et *Pax9* dans le développement des membres

Les gènes de la famille *Pax* contiennent tous un motif conservé appelé la boîte *paired*. *Pax1* est exprimé dans les somites et dans le squelette axial en formation où il joue un rôle important dans le développement de la colonne vertébrale (Deutsch et al., 1988; Wallin et al., 1994). Ce rôle a été démontré par l'analyse de la souris *undulated* (*un*) qui comprend une mutation ponctuelle dans la séquence codante pour la boîte *paired* menant à la substitution d'un acide aminé dans le domaine de liaison à l'ADN de *Pax1* (Balling et al., 1988; Treisman et al., 1991). Cette mutation affecte ainsi l'affinité et la spécificité de la liaison à l'ADN (Chalepakis et al., 1991). Cette souris présente de sévères malformations des vertèbres et des disques intervertébraux de la colonne. *Pax1* est aussi exprimé dans le bourgeon de membre en développement dans la région antéro-proximale, plus intensément du côté dorsal à partir de e10 dans le bourgeon antérieur et e11 dans le bourgeon postérieur (Timmons et al., 1994). L'analyse du phénotype d'une variété de souris porteuses d'une combinaison entre trois allèles mutants *undulated* a démontré l'importance de *Pax1* lors de la formation d'une structure particulière de la jonction articulaire de l'épaule, l'acromion (Timmons et al., 1994). En effet, les souris mutantes pour *Pax1* montrent un défaut de chondrification de l'acromion, parfois remplacé par un restant de ligament rejoignant l'omoplate à l'humérus. Toutefois, les souris mutantes pour

Pax1 ne présentent aucun défaut ni du développement des membres postérieurs, ni de la formation de la ceinture pelvienne (Timmons et al., 1994).

Pax9, un autre membre de la famille des facteurs de transcription à boîte *paired*, est d'abord exprimé à e8,5 dans l'épithélium de l'intestin antérieur (Neubuser et al., 1995). Dès e9,5, *Pax9* est exprimé dans le sclérotome, dans la poche pharyngiale et dans l'intestin postérieur et le mésenchyme sous-jacent. À e10,5, *Pax9* est exprimé dans le mésenchyme facial et dans le thymus. (Neubuser et al., 1995). À e11,5, l'expression de *Pax9* est forte dans le coin antéro-proximal du bourgeon de membre lorsqu'il acquiert le stade du bourgeon de forme palmé, se prolongeant du côté dorsal vers le côté ventral. Toutefois, du côté ventral, l'expression de *Pax9* se prolonge un peu plus postérieurement et proximale. L'expression de *Pax1* débute donc un jour plus tôt que celle de *Pax9*. Au cours de la 12^e journée de développement, l'expression de *Pax9* commence à s'étendre vers le côté postérieur et à se restreindre du côté ventral. Jusqu'à e14,5, l'expression de *Pax9* est restreinte au mésenchyme entre le tibia et le fémur, c'est-à-dire la région correspondant à la future articulation du genou. En comparaison, l'expression distale de *Pax1* dans le membre en développement est beaucoup plus faible, restreinte à l'extrémité distale du fémur et à la région entre le tibia et le péroné.

Peters et al. ont généré un allèle nul de *Pax9* par l'introduction de la séquence codante pour le gène *LacZ* (Peters et al., 1998). Les embryons homozygotes pour *Pax9^{LacZ}* développent une duplication du doigt #1 au niveau des membres antérieurs et postérieurs. De plus, au niveau des membres postérieurs, le centre d'ossification de

la première phalange est grandement réduite et les métatarses antérieurs sont anormalement élargis et fusionnés. Ce phénotype est moins prononcé au niveau des membres antérieurs puisque le doigt #1 surnuméraire ne se sépare pas du pouce. Les premiers signes de malformations des membres peuvent être observés dès e13,5 par un épaississement de la région antéro-proximale du bourgeon. L'analyse des mutants a permis de démontrer que *Pax9* régule le patterning du mésenchyme antérieur et que ce processus est nécessaire à la restriction du patron d'expression de *Pax9*. Lors de l'absence de *Pax9*, il y a formation de mésenchyme supplémentaire dans la région antérieure qui sera par la suite transformé en un doigt surnuméraire et en cartilage ectopique au centre de la main ou du pied. Au niveau du tibia, l'expression de *LacZ* sous contrôle des régions régulatrices de *Pax9* s'avère être prolongée au niveau proximal et ventral chez les mutants. Chez les embryons contrôles, *Pax9* est exprimé dans des tissus non-cartilagineux incluant deux tendons appartenant à un groupe de trois muscles situés du côté ventral du tibia. L'analyse des mutants a montré que l'ablation de *Pax9* cause la perte d'un de ces tendons et du muscle qui lui est associé (Peters et al., 1998).

Les souris mutantes pour *Pax1* (*Pax1*^{-/-}) et les souris mutantes pour *Pax9* (*Pax9*^{LacZ/LacZ}) ont été croisées ensemble afin de générer les souris doubles mutantes. L'analyse de celles-ci a montré la synergie existante entre ces deux gènes quant au développement de la colonne vertébrale, au maintien de l'expression de gènes spécifiques aux chondrocytes dans le sclérotome et le contrôle de la prolifération cellulaire (Peters et al., 1999). Malheureusement, de possibles défauts de

développement au niveau des membres, aggravés par l'absence de ces deux gènes, n'ont pas été rapportés.

1.5.1 Régulation de l'expression de *Pax1* et *Pax9* dans le bourgeon de membre

Des travaux ont montré que la signalisation par la voie des BMPs est capable de réguler négativement l'expression de *Pax1* et de *Pax9* dans le bourgeon de membre en développement (Hofmann et al., 1998; McGlinn et al., 2005). Il s'avère que *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7*, en plus d'être exprimés dans l'AER et l'ectoderme ventral, sont exprimés au niveau du mésenchyme postérieur. De plus, *Bmp4* et *Bmp7* sont retrouvés dans la région antérieure du mésenchyme, dans la région tout juste adjacente au domaine d'expression de *Pax1* (Francis et al., 1994; Francis-West et al., 1995; Hofmann et al., 1998). Comme les patrons ont été observés au niveau du transcrit par hybridation *in situ* et non au niveau de la protéine, il est possible que la signalisation via les BMPs puisse restreindre l'expression de *Pax1* au domaine proximal du bourgeon. L'application de billes trempées dans BMP2 et/ou BMP4 dans la région proximale du bourgeon de membre antérieur avant l'induction de *Pax1* conduit à la perte d'expression de ce dernier et mène à la perte de l'acromion (nécessaire à l'articulation entre l'omoplate et l'humérus) en plus d'une hypoplasie de l'humérus (Hofmann et al., 1998). Ceci rappelle le phénotype de la souris *Pax1*^{-/-} (Dietrich and Gruss, 1995; Timmons et al., 1994). Il est intéressant de noter que le phénotype résultant de l'application de ces billes comprend aussi la perte du radius et du doigt ^{#1}, phénotype qui ne peut s'expliquer que par la perte de l'expression de

Pax1. Premièrement, l'expression de *Pax1* est restreinte à un domaine beaucoup plus proximal du bourgeon et des études de traçage cellulaire chez le poulet ont montré que les cellules de cette position sont destinées à former l'articulation de l'omoplate et l'humérus (Bowen et al., 1989; Vargesson et al., 1997; Saunders, 1948). Deuxièmement, l'ablation de *Pax1* ne cause aucun phénotype au-delà de la région proximale de l'humérus (Timmons et al., 1994). Hofman et al. concluent donc que les BMPs ont vraisemblablement d'autres effets et que la régulation d'autres gènes doit être affectée lors de l'application des billes de BMPs (Hofmann et al., 1998). Par homologie, on peut penser que l'application de billes de BMPs puisse avoir des effets négatifs sur la régulation de l'expression de *Pax9*.

Et, effectivement, des travaux d'un autre groupe ont montré que l'application de billes trempées dans Shh ou Bmp2 au niveau du mésoderme antérieur du bourgeon chez le poulet a pour conséquence une perte d'expression de *Pax9* (McGlenn et al., 2005). De plus, il a été reporté que Fgf8 induit l'expression de *Pax9* dans le mésenchyme de la mandibule et que cette induction est inhibée par les BMPs (Neubuser et al., 1997). L'expression de *Pax9* dans tout le mésoderme du bourgeon selon l'axe A/P chez les embryons *Shh*^{-/-} supporte l'hypothèse d'un rôle négatif de la signalisation par Shh dans la régulation de l'expression de *Pax9* (McGlenn et al., 2005). Tout ceci en considération, l'hypothèse d'une régulation négative de *Pax9* par les BMPs dans le mésenchyme antérieur du bourgeon en croissance est par conséquent tout à fait envisageable.

1.6 Hypothèses de travail

Les facteurs de transcription à homéodomaine *Pitx1* et *Pitx2* sont nécessaires au développement des membres postérieurs. L'inactivation de *Pitx1*, exprimé exclusivement dans les membres postérieurs, est suffisante pour causer la transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs (voir **figure 1.3**, p. 40) (Lancôt et al., 1999; Szeto et al., 1999). Si on ajoute à cela la mutation de *Pitx2*, le phénotype observé est un défaut de croissance des bourgeons de pénétrance variable, qui mène à une perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs des membres postérieurs, soit l'ilion, le fémur, le tibia et les doigts #1 et #2 (voir **figure 1.4**, p. 44) (Marcil et al., 2003).

Les travaux récents de notre collaborateur, le Dr C. C. Hui de l'Université de Toronto, ont montré l'implication des facteurs de transcription de la famille des Iroquois (*Irx*) lors de la croissance et la formation des membres. Au niveau des membres postérieurs, l'inactivation de *Irx3* et *Irx5* cause une perte de croissance des bourgeons selon l'axe A/P ainsi qu'une perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs (voir **figure 1.7**, p. 60), rappelant le phénotype observé chez les souris mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2*. Cette phénocopie partielle entre ces deux doubles mutants ainsi que la superposition des patrons d'expression de *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* dans la région antéro-proximale du bourgeon dès son émergence de la lame latérale nous amènent à poser trois hypothèses principales de travail :

- (1) les *Pitx* sont responsables de l'expression de *Irx* dans les bourgeons de membres postérieurs ;
- (2) à l'inverse, les *Irx* dirigent l'expression des *Pitx* dans les bourgeons postérieurs ;
- (3) les *Pitx* et les *Irx* participent ensemble au programme génétique de croissance des bourgeons postérieurs.

Ainsi, dans le but de vérifier si les facteurs de transcription *Pitx* contribuent à l'expression des gènes *Irx*, nous allons déterminer si l'expression des *Irx* est affectée par l'inactivation génétique des *Pitx*, tel que produit expérimentalement chez les souris souris *Pitx1*^{-/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. En parallèle, le patron d'expression de *Pitx1* sera observé par notre collaborateur chez les souris mutantes *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (C. C. Hui, comm. pers.). Ensuite, afin de vérifier la troisième hypothèse, nous investigerons l'interaction transcriptionnelle entre les facteurs *Pitx* et *Irx* sur un promoteur générique ainsi que sur des régions conservées du locus de *Tbx4*, un gène cible de *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur. Enfin, comme il a été démontré que l'inactivation de *Irx3* et *Irx5* entraîne une absence d'expression de *Pax9* exclusivement dans le bourgeon de membre postérieur, nous vérifierons l'expression de *Pax9* chez les mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*.

Chapitre 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1 Souris

Les embryons *Pitx1*^{-/-} ont été obtenus par croisement entre les souris *Pitx1*^{+/-}. Le phénotype des embryons *Pitx1*^{-/-} a déjà été décrit (Lanctôt et al., 1999). Les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} ont été obtenu par croisement entre *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+ /néo}, eux-mêmes obtenus à partir de croisements entre des hétérozygotes pour chacun de ces gènes. Le phénotype des embryons *Pitx2*^{néo/néo}, *Pitx2*^{-/-}, *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}, *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} ainsi que du seul embryon *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{-/-} à avoir été jamais généré ont été décrits (Marcil et al., 2003; Gage et al., 1999). Toutes les souris utilisées dans cette étude provenaient d'un fond génétique mixte. Le génotypage a été fait par PCR comme décrit précédemment (Gage et al., 1999; Lanctôt et al., 1999) sur l'ADN génomique isolé des queues dans le cas des nouveaux-nés et du cordon ombilical ou des membranes amniotiques dans le cas des embryons. Des réactions de PCR séparées ont été faites pour le génotypage de *Pitx1* et de *Pitx2*. L'âge approximatif des embryons a été évalué par la date d'apparition du bouchon vaginale chez la femelle, midi étant considéré comme ~e0,5.

2.2 Hybridation *in situ* sur embryons entiers

Les hybridations *in situ* sur embryons entiers ont été faites comme suit. Brièvement, les embryons sont fixés dans 4% PFA/PBS à 4°C, déshydratés au méthanol et blanchis au peroxyde/méthanol, réhydratés dans 0,1% Triton/PBS. Après

un traitement à la protéinase K (10ug/uL, de 8 à 11 minutes selon la grosseur des embryons) et un lavage à la glycine (2mg/mL) à 4°C, les embryons sont de nouveau fixés avec 4% PFA/PBS pendant 20 minutes à température ambiante avant d'être lavés plusieurs fois avec 0,1% Triton/PBS. Ensuite les embryons sont pré-hybridés pendant 2 heures à 68°C avec la solution d'hybridation (50 % formamide, 0,75 M NaCl, 0,085 M NaCitrates, pH = 4,5, 1 % SDS, 0,1 % Triton) et hybridés toute la nuit à 63°C avec agitation avec la solution d'hybridation contenant la sonde pré-dénaturée à 80°C pendant 10 minutes. Les sondes ont été générées par transcription *in vitro* en incluant un nucléotide marqué, le Dig-UTP et purifiées à l'aide des colonnes ProbeQuant G-50 (GE Healthcare). Les matrices utilisées pour produire les sondes ont été fournies par C. C. Hui (*Irx3*, *Irx5* et *Pax9*) ; *Pitx1* et *Pitx2* ont été produites comme précédemment (Marcil et al., 2003). Les embryons sont ensuite lavés plusieurs fois avec différentes solutions de lavage (L2 : 50 % formamide, 0,75 M NaCl, 0,085 M NaCitrates, pH = 4,5, 0,1 % Triton et L3 : 0,75 M NaCl, 0,085 M NaCitrates, pH = 4,5, 0,1 % Triton), puis incubés toute la nuit à 4°C avec un anticorps contre le Dig et couplé à la phosphatase alcaline (Roche). Ils sont ensuite lavés avec 0,1% Triton/PBS et colorés avec le substrat BM Purple (Roche).

2.3 Culture cellulaire et transfections

Les cellules COS sont des cellules transformées avec SV40LT à partir des CV-1 qui sont des cellules de rein du singe vert d'Afrique. Elles sont cultivées dans du « Dulbecco's modified Eagle medium » (DMEM) enrichie avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline/streptomycine, à 37°C dans un environnement

contenant 5 % de CO₂. Les transfections ont été réalisées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium. Les cellules sont d'abordensemencées à environ 100 000 cellules par puits, sur des plaques contenant 12 puits, un jour avant la transfection. Les ADN sont préparés de sorte que les mélanges pour chaque puits contiennent environ 1,5 ug de plasmide rapporteur, de 0 à 500 ng de vecteur d'expression complété avec du vecteur d'expression vide pour toujours avoir un total constant à 500 ng de vecteur d'expression, le tout complété à 3 ug par puits d'ADN entraîneur (psp64) dans un volume final de 25 µL. Dans le cas des expériences avec Gal4DBD, ou Gal4DBD_CtermPitx1, deux courbes réponses avec des doses croissantes de vecteur d'expression de Gal4DBD et Gal4DBD_CtermPitx1 ont été faites de 0 ng à 500 ng par duplicata. Ensuite, nous avons utilisé 250 ng de vecteur d'expression pour Gal4DBD ou Gal4DBD_CtermPitx1 par puits pour y ajouter des doses croissantes de vecteur d'expression pour Irx3 ou Irx5, allant de 0 ng à 500 ng par puits. Dans le cas des expériences avec les gènes rapporteurs candidats, nous avons effectué des courbes standards en utilisant de 0 ng à 250 ng de vecteur d'expression de Pitx1 par puits. Nous avons par la suite utilisé 25 ng de vecteur d'expression de Pitx1 par duplicata avant d'y ajouter de 0 ng à 250 ng de vecteur d'expression pour Irx3 ou Irx5. Le milieu des cellules est renouvelé quatre heures avant la transfection. Les précipités d'ADN sont formés à partir d'un mélange d'ADN auquel on ajoute 50 µL de solution CaCl₂, le tout déposé sur 100 uL de solution HBS. Après 30 minutes d'incubation, le précipité est réparti sur deux puits. Le milieu des cellules est renouvelé après 24 heures. Les cellules sont lysées après un autre 24 heures d'incubation en appliquant directement sur les cellules 200 uL de tampon d'essai luciférase (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% NP-40). 100 uL de lysat

cellulaire sont utilisés pour mesurer l'activité luciférase, avec un luminomètre Glomax de Promega. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes, effectuées en duplicata, plus ou moins l'écart-type sur la moyenne.

Chapitre 3

RÉSULTATS

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Les patrons d'expression de *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* se chevauchent dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur

Les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} présentent un phénotype comprenant un défaut de croissance du bourgeon de membre postérieur qui se traduit par une perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs, soit l'ilion, le fémur, le tibia et le doigt^{#1} (voir **figure 1.4**, p. 44) (Marcil et al., 2003). De la même façon, les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} présentent aussi la perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs exclusivement aux membres postérieurs (voir **figure 1.7**, p. 60) (C. C. Hui, comm. pers.). La phénocopie observée au niveau des membres postérieurs entre les doubles mutants *Pitx1/Pitx2* et les doubles mutants *Irx3/Irx5* laisse entendre la participation de ces deux paires de gènes au même programme génétique de développement des membres postérieurs. Il est d'ores et déjà connu que l'expression de *Pitx1* débute dans le mésoderme de la lame latérale de la région postérieure de l'embryon dès la gastrulation à e6,5 et se poursuit dans tout le mésenchyme du bourgeon de membre postérieur lors sa croissance (Lanctôt et al., 1997; Szeto et al., 1999). Afin de valider la spécificité des sondes employées, nous avons de nouveau confirmé cette expression par hybridation *in situ* sur embryons entiers à e10,5 et e11,5 (voir **figure 3.1 A, E**, p. 76). *Pitx2*, quant à lui, est exprimé dans le mésoderme de la lame latérale adjacent au bourgeon de membre, tel que présenté par hybridation *in situ* sur embryon entier à e10,5 (voir **figure 3.1 B**, p. 76) (L'Honoré et al., 2007;

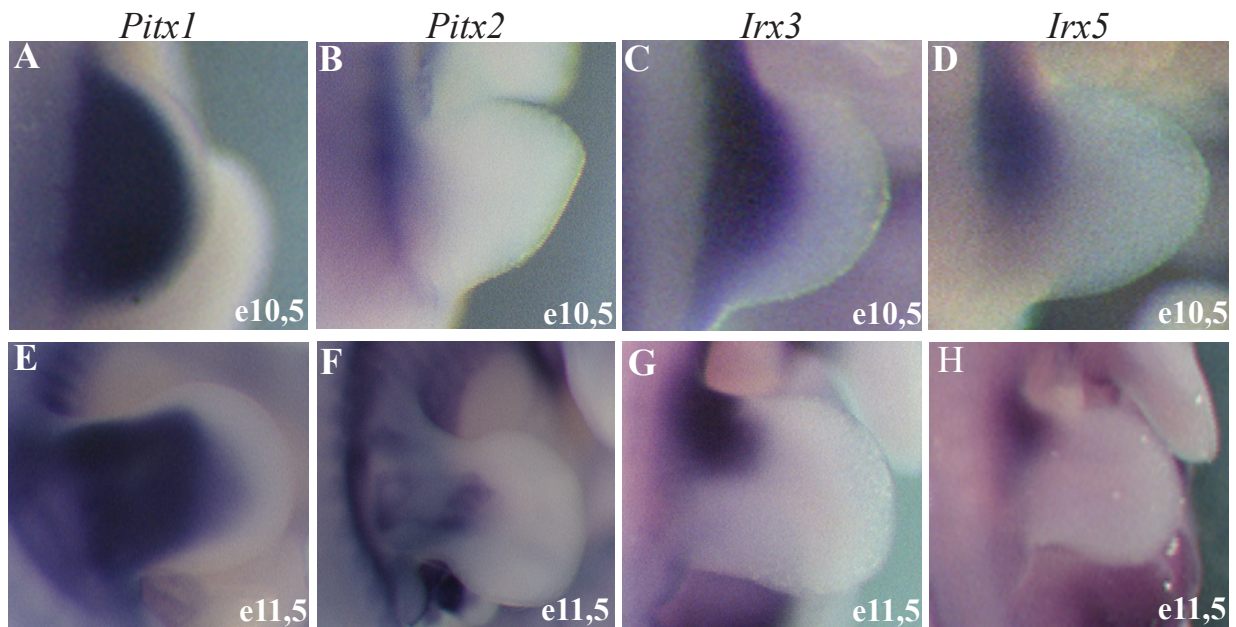


Figure 3.1. Les patrons d'expression de *Pitx1*, *Pitx2*, *Irx3* et *Irx5* lors du développement des membres postérieurs à e10,5 et e11,5. Hybridation *in situ* sur embryons entiers montrant les patrons d'expression de *Pitx1*, *Pitx2*, *Irx3* et *Irx5* dans le bourgeon de membre postérieur à e10,5 et e11,5. *Pitx1* est exprimé dans le mésoderme de la lame latérale et du bourgeon en développement, à e10,5 (A) et e11,5 (E). *Pitx2* est exprimé dans le mésoderme de la lame latérale (le somatopleure) à e10,5 (B) et e11,5 (F) ainsi que dans les masses musculaires du bourgeon à e11,5 (F). *Irx3* (C et G) et *Irx5* (D et H) ont des patrons d'expression similaires dans le bourgeon de membre postérieur, exprimés dans la région proximale et antérieure du bourgeon à e10,5 (C et D) et e11,5 (G et H).

Shih et al., 2007). Cette expression est maintenue à e12,5, en plus de se retrouver dans les masses musculaires en formation dans le bourgeon (voir **figure 3.1 F**, p. 76) (L'Honoré et al., 2007; Shih et al., 2007). *Irx3* et *Irx5* possèdent des patrons d'expression très similaires dans le bourgeon de membre en développement. En effet, bien que l'expression de *Irx5* soit moins prononcée, les deux gènes sont exprimés dans la région proximale du bourgeon à e10,5. Cette expression est ensuite restreinte dans la région antéroproximale, d'une façon plus prononcée du côté dorsal (voir **figure 3.1 C-D, G-H**, p. 76) (Houweling et al., 2001). Ainsi, *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* possèdent des patrons d'expression qui se chevauchent dans la région proximale du bourgeon de membre postérieur à e10,5, puis dans la région antéroproximale à e11,5. Il est intéressant de noter que la région commune d'expression entre ces gènes correspond à la région présumée donnant naissance aux régions affectées chez les deux types d'embryons doubles mutants, soit les éléments squelettiques proximaux et antérieurs (Bowen et al., 1989; Vargesson et al., 1997; Saunders, 1948).

3.2 Étude de la hiérarchie transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx* lors du développement du bourgeon de membre postérieur

En raison de la phénocopie observée au niveau des membres postérieurs entre les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} et les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} et de l'expression de ces facteurs dans les mêmes régions du bourgeon de membre postérieur en développement, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle il existe une cascade de régulation transcriptionnelle entre ces deux familles de gènes lors du développement du bourgeon de membre postérieur. Nous avons donc décidé de vérifier, par

hybridation *in situ* sur embryons entiers, l'expression de *Irx3* et *Irx5* chez les embryons mutants pour *Pitx1* et les doubles mutants *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. De la même façon, l'expression de *Pitx1* a été observée par hybridation *in situ* chez les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (C. C. Hui, comm. pers.). Ces expériences ont permis d'évaluer s'il y a une cascade de régulation transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx* lors du développement du bourgeon de membre postérieur et d'en évaluer la hiérarchie.

3.2.1 Maintien de l'expression de *Irx3* et *Irx5* chez les embryons mutants pour *Pitx1* et les mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*.

Nous avons débuté par les croisements pour l'obtention des embryons mutants pour *Pitx1* et pour *Pitx1/Pitx2*. Nous avons choisi d'évaluer l'expression des gènes *Iroquois* chez les doubles mutants *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} puisque ceux-ci sont plus faciles à obtenir que les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-}, bien que les phénotypes encourus soient comparables (Marcil et al., 2003). En effet, lors des croisements précédents, ayant pour but l'analyse du rôle de *Pitx1* et *Pitx2* au cours du développement des membres, il fût très difficile d'obtenir des souris doubles hétérozygotes *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/-}. Au lieu d'obtenir des ratios mendéliens, les croisements entre *Pitx1*^{+/-} et *Pitx2*^{+/-} n'ont généré que 2% de *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/-} (Marcil et al., 2003). Nous avons donc choisi d'utiliser l'allèle hypomorphe *néo* de *Pitx2* pour les analyses subséquentes. Nous avons procédé par hybridation *in situ* sur embryons entiers à e11,5 afin d'observer le profil d'expression de *Irx3* et *Irx5* chez les embryons doubles hétérozygotes (*Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/*néo*}) connus pour ne présenter

aucun phénotype particulier (Marcil et al., 2003), chez les mutants *Pitx1* (*Pitx1*^{-/-}; *Pitx2*^{+/*néo*}), et les doubles mutants *Pitx1/2* (*Pitx1*^{-/-}; *Pitx2*^{néo/néo}). Les profils d'expression de *Irx3* et *Irx5* sont tels qu'attendus dans le cas des doubles hétérozygotes servant de contrôles (voir **figure 3.2 A, D**, p. 80) (Houweling et al., 2001). On y observe une expression restreinte de *Irx3* et de *Irx5* au niveau proximal du bourgeon, principalement du côté antérieur. Ce profil est toujours retrouvé malgré l'inactivation des deux allèles de *Pitx1* (voir **figure 3.2 B, E**, p. 80), de même que lors de l'inactivation de *Pitx1* et la présence de deux allèles hypomorphes de *Pitx2* (voir **figure 3.2 C, F**, p. 80). Ainsi, malgré la complète absence de *Pitx1* et l'atténuation de l'expression des deux allèles de *Pitx2*, l'expression des *Iroquois* dans le bourgeon de membre postérieur à e11,5 demeure inchangée. Ceci nous amène à conclure que les deux gènes *Pitx* ne sont pas essentiels à l'expression de *Irx3* et *Irx5* dans le bourgeon de membre postérieur en développement.

En parallèle, le groupe de C. C. Hui a vérifié si les facteurs de transcription *Irx3* et *Irx5* étaient responsables de l'expression de *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur en développement. Pour ce faire, l'expression de *Pitx1* a été évaluée chez les embryons mutants *Irx3*^{-/-}; *Irx5*^{-/-}. Il s'est avéré que malgré l'inactivation de *Irx3* et de *Irx5*, le patron d'expression de *Pitx1* demeure inchangé dans le bourgeon de membre postérieur, présent dans tout le mésenchyme à e11,5 (C. C. Hui, comm. pers.). Ainsi, ces derniers concluent que l'action des facteurs *Iroquois* dans le bourgeon de membre postérieur n'est pas nécessaire à l'expression de *Pitx1*. Ceci, ainsi que l'observation d'une expression normale des *Irx* chez les mutants pour les *Pitx*, nous permet de conclure que la phénocopie observée entre les embryons

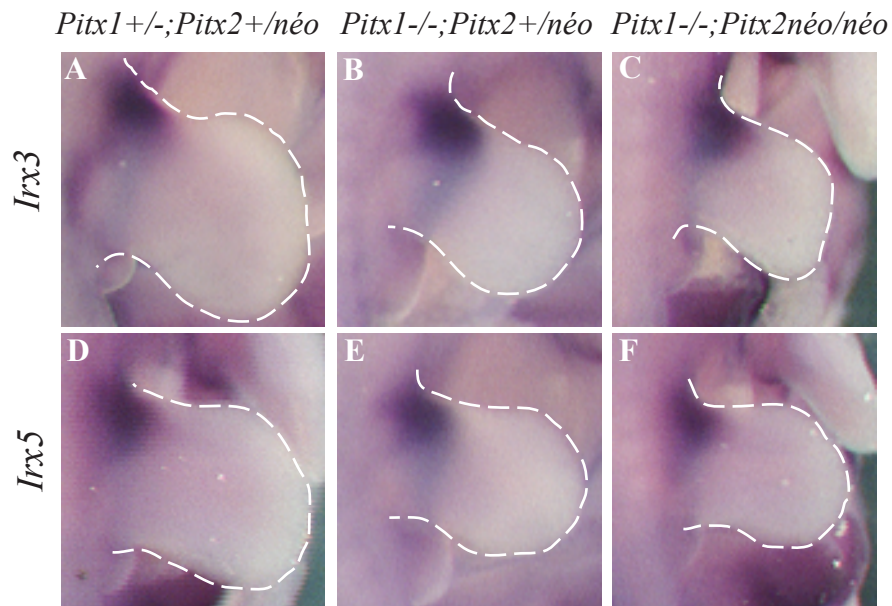


Figure 3.2. Maintien de l'expression de *Irx3* et *Irx5* dans le bourgeon de membre postérieur des embryons *Pitx1*^{-/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. Hybridations *in situ* sur embryons entiers montrant l'expression de *Irx3* (A-C) et *Irx5* (D- F) à e 11,5 dans le bourgeon de membre postérieur chez les embryons contrôles *Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/néo} (A, D), *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/néo} (B, E) et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} (C, F). L'expression de *Irx3* et *Irx5* est maintenue dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur malgré l'inactivation des deux allèles de *Pitx1* et la présence de deux allèles hypomorphes de *Pitx2*.

Pitx1^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} et *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} ne peut s'expliquer par une cascade d'interrégulation transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx* dans le bourgeon de membre postérieur en développement.

3.3 Étude de l'interaction fonctionnelle entre les Pitx et les Irx

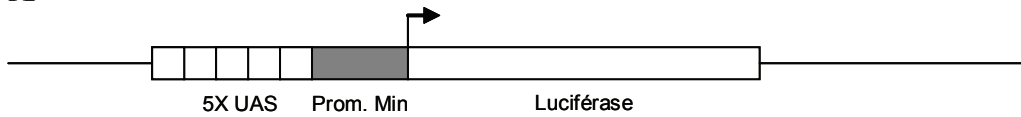
3.3.1 Étude de l'interaction transcriptionnelle entre Pitx1 et Irx3/5

La phénocopie au niveau des membres postérieurs chez les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} et les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} pourrait s'expliquer par l'interaction de ces facteurs de transcription sur les mêmes cibles transcriptionnelles lors du développement du bourgeon de membre postérieur. Nous avons commencé l'analyse des capacités d'interaction transcriptionnelle entre les Pitx et les Irx à l'aide d'une protéine de fusion et d'un promoteur générique. Ensuite, comme les cibles transcriptionnelles des Irx au cours du développement des membres postérieurs sont encore inconnues, nous avons examiné s'il existe une interaction transcriptionnelle entre Pitx1 et Irx3/Irx5 sur les régions conservées du locus de *Tbx4*, un gène cible de *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur en développement.

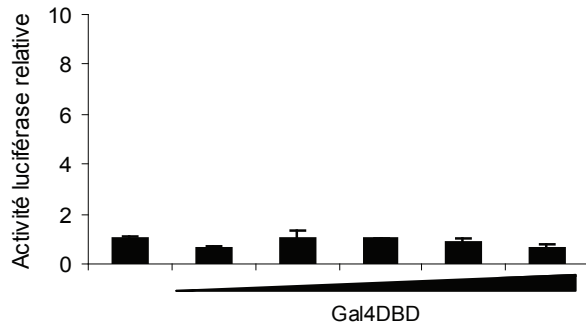
3.3.1.1 Essais transcriptionnels avec une protéine de fusion entre le domaine activateur de Pitx1 et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et Irx3/Irx5 sur un promoteur générique (5XUAS)

En premier lieu, pour confirmer les capacités d'activation transcriptionnelle de Pitx1, nous avons co-transfecté dans des cellules COS un vecteur codant pour la protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4 et le domaine C-terminal activateur de Pitx1 (Gal4DBD_CtermPitx1) et un vecteur rapporteur codant pour la luciférase en aval d'un promoteur minimal et cinq répétitions de l'élément de régulation transcriptionnelle de la protéine Gal4 (UAS) (voir **figure 3.3 A**, p. 83) (Tremblay et al., 1999). Nous n'avons utilisé que le domaine C-terminal de Pitx1 puisque les séquences connues pour être responsables des fonctions d'activation transcriptionnelle de Pitx1 y sont circonscrites (Tremblay et al., 1999). Tous les résultats de transfection présentés (voir **figure 3.3**, p. 83 et **figure 3.4**, p. 86) sont représentatifs de deux expériences indépendantes, faites en duplicata, plus ou moins l'écart-type sur la moyenne

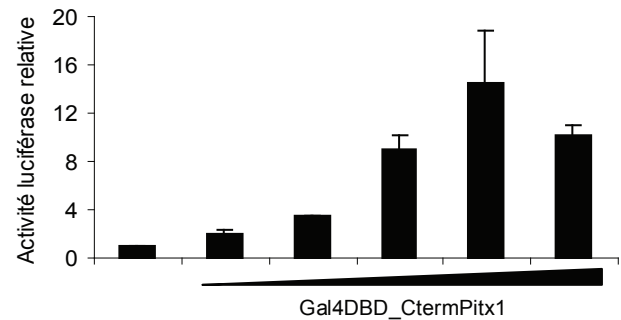
Tel qu'attendu, le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (Gal4DBD) seul est incapable d'activer la transcription du gène rapporteur puisqu'il ne contient pas de régions de transactivation (voir **figure 3.3 B**, p. 83). Au contraire, la protéine de fusion Gal4DBD_CtermPitx1 est en mesure d'activer de façon dose-dépendante la transcription de la luciférase, jusqu'à un maximum d'environ 14 fois (voir **figure 3.3 E**, p. 83). Ceci est en accord avec les résultats sur les capacités activatrices de Pitx1 déjà publiés (Tremblay et al., 1999).



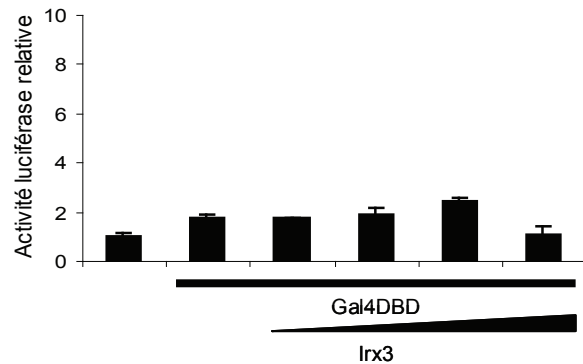
B



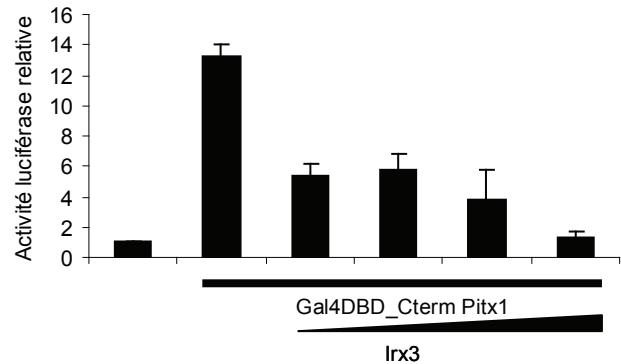
E



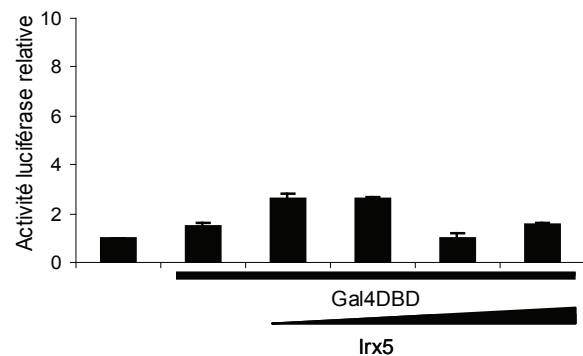
C



F



D



G

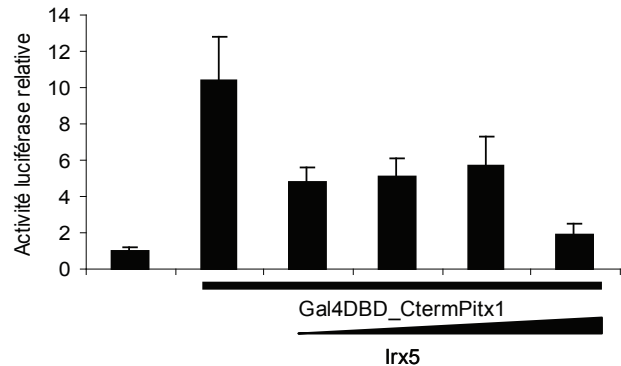


Figure 3.3. Essai d'interaction transcriptionnelle entre Pitx1 et Irx3/Irx5 à l'aide d'une protéine de fusion Gal4DBD_CtermPitx1 et du promoteur générique 5X UAS. (A) Représentation schématique du vecteur rapporteur comprenant cinq répétitions de l'élément de liaison à l'ADN de Gal4 (UAS) en amont d'un promoteur minimal contenant la boîte TATA, le tout en amont du gène codant pour la luciférase.

(B) Aucun effet n'est observé lors de la co-transfection dans les cellules COS du vecteur codant pour Gal4DBD avec le vecteur rapporteur. (C) La co-transfection de doses croissantes de vecteur codant pour Gal4DBD_CtermPitx1 avec le vecteur rapporteur montre l'effet activateur de la région C-terminale de Pitx1 allant jusqu'à 15 fois. Alors que l'ajout de doses croissantes de vecteurs codants soit pour Irx3 (C), soit pour Irx5 (D) en présence d'une dose constante de vecteur codant pour Gal4DBD n'a aucun effet sur le gène rapporteur, l'ajout de doses croissantes de vecteurs codants soit pour Irx3 (F), soit pour Irx5 (G) en présence d'une dose constante de vecteur codant pour Gal4DBD_CtermPitx1 antagonise l'effet activateur de Gal4DBD_CtermPitx1, ramenant l'activation de la transcription du gène rapporteur à son niveau initial. Les résultats présentés sont représentatifs de deux expériences indépendantes, effectuées en duplicata, plus ou moins l'écart-type sur la moyenne.

Comme contrôles, nous avons ajouté des doses croissantes de vecteurs codant pour Irx3 ou pour Irx5 à une dose constante de vecteurs codants pour Gal4DBD (voir **figure 3.3 B-D**, p. 83). Ces expériences n'ont montré aucune interaction transcriptionnelle, ce qui indique que les protéines Irx3 et Irx5 n'interagissent pas fonctionnellement avec Gal4DBD.

Ensuite, afin d'évaluer les capacités d'interaction transcriptionnelle entre la région C-terminale de Pitx1 et les Irx, nous avons co-transfecté une dose constante du vecteur codant pour Gal4DBD_CtermPitx1 en présence de doses croissantes des vecteurs codant pour Irx3 ou Irx5.

L'activation de la transcription d'environ 12 fois par Gal4DBD_CtermPitx1 est inhibée lors de l'ajout de doses croissantes de vecteurs codant pour Irx3 ou pour Irx5 (voir **figure 3.3 E-G**, p. 83). L'ajout d'une faible dose de Irx3 ou de Irx5 à la présence de Gal4DBD_CtermPitx1 suffit pour ramener l'activation de la transcription d'environ 11 fois à seulement 5 fois. De plus, la réduction de l'activation transcriptionnelle de Gal4DBD_CtermPitx1 est proportionnelle à la dose ajoutée de vecteurs codant pour Irx3 ou Irx5. La dose maximale utilisée de vecteurs codant pour Irx3 ou Irx5 ramène le niveau de transcription de la luciférase au niveau initial malgré la présence de Gal4DBD_CtermPitx1.

3.3.1.2 Essais transcriptionnels avec *Pitx1* et *Irx3/Irx5* sur des régions conservées du locus de *Tbx4*

Toujours dans le but de tester l'existence d'une interaction fonctionnelle entre *Pitx1* et *Irx3/Irx5*, nous avons décidé de procéder à des co-transfections avec un gène rapporteur luciférase en aval des régions conservées d'un gène connu pour être activé par *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur en développement. *Tbx4*, un gène spécifiquement exprimé dans le bourgeon de membre postérieur, est reconnu comme étant sous contrôle de *Pitx1*. D'une part, il a été démontré que l'expression de *Pitx1* précède celle de *Tbx4* dans le bourgeon de membres postérieurs en développement. D'autre part, l'expression de *Tbx4* est affaiblie lors de l'inactivation de *Pitx1* chez la souris et engendrée par l'expression ectopique de *Pitx1* dans le membre antérieur de poulet (Lanctôt et al., 1999; Szeto et al., 1999; Chapman et al., 1996; Szeto et al., 1999). De plus, des essais transcriptionnels en transfection ont montré que certaines de ces régions conservées du locus de *Tbx4* pouvaient répondre aux fonctions activatrices de *Pitx1* (Dumontier, 2005). Nous avons donc choisi de poursuivre notre analyse avec chacune de ces régions (voir **figure 3.4 A**, p. 86).

En premier lieu, nous avons pu observer que *Pitx1* est capable d'activer la transcription, jusqu'à presque 6 fois le niveau initial, et de façon dose-dépendante, via la région conservée située à environ -9 kb du site d'initiation de la transcription de *Tbx4*, appelée Région A (voir **figure 3.4 B**, p. 86), ceci en accord avec les résultats pré-établis (Dumontier, 2005). Bien que les réponses soient moins prononcées, une activation de la transcription de façon dose-dépendante est observable lors de l'ajout

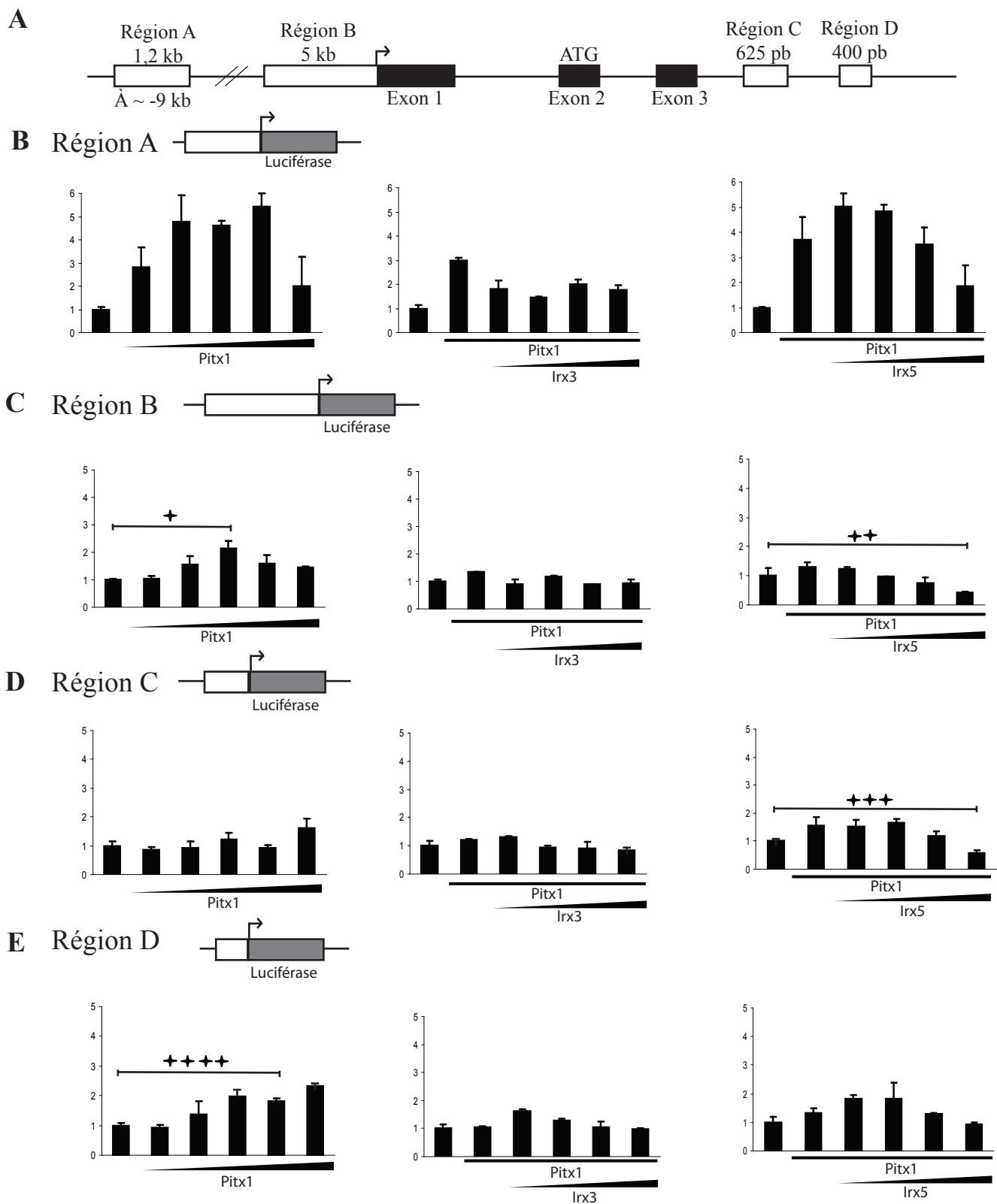


Figure 3.4. Essai d'interaction transcriptionnelle entre Pitx1 et Irx3/Irx5 sur les régions conservées du locus de *Tbx4*. (A) Représentation schématique du locus de *Tbx4*. Les régions conservées du locus de *Tbx4* testés sont représentés par des boîtes blanches tandis que les exons sont représentés par des boîtes noires. (B) Pitx1 est capable d'activer la transcription de la luciférase via la région A. L'ajout de Irx3 ou Irx5 antagonise l'effet activateur d'une dose constante de Pitx1. Des doses croissantes de Pitx1 activent très peu la transcription via la région B (C) ou la région D (E), mais n'activent pas via la région B (D). L'ajout de Irx3 ou Irx5 sur une dose constante de Pitx1 ramène le taux de transcription au niveau initial (E) ou réprime la transcription en deça du niveau initial (C,D). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes, effectuées en duplicata, plus ou moins l'écart-type sur la moyenne. (+) : $p = 0,016$. (++) : $p = 0,023$. (+++) : $p = 0,007$. (++++) : $p = 0,003$.

de vecteur codant pour Pitx1 sur la région de 5 kb en amont de l'exon 1 de *Tbx4* (Région B) ($p = 0,016$), ainsi qu'avec une des deux régions situées dans l'intron 3 (Région D) ($p = 0,003$), toutes contenant des sites consensus de liaison pour les Pitx (voir **figure 3.4 C, E**, p. 86) (Dumontier, 2005). Par contre, malgré l'ajout de doses croissantes de Pitx1 et la présence de sites consensus de liaison pour les Pitx dans la Région C, nous n'observons pas d'activation de la transcription de la luciférase via cette région (voir **figure 3.4 D**, p. 86).

En utilisant une dose intermédiaire de vecteurs codant pour Pitx1, nous avons ensuite testé l'interaction fonctionnelle entre Pitx1 et Irx3/Irx5 sur chacune de ces régions conservées du locus de *Tbx4*. En général, l'ajout de doses croissantes de vecteurs codant pour Irx3 ou Irx5 nous donne le même résultat que lors de l'expérience avec Gal4DBD_CtermPitx1 et le promoteur générique (voir **figure 3.3**, p. 83). Lorsque l'ajout de Pitx1 résulte en une activation de la transcription, c'est-à-dire avec les Régions A, B et D, nous observons une interférence de l'effet activateur de Pitx1 autant lors de l'ajout de Irx3 que de Irx5 (voir **figure 3.4 B, C, E**, p. 86). Bien que les réponses transcriptionnelles soient moins prononcées qu'avec la protéine de fusion et le promoteur générique, nous observons une interaction fonctionnelle entre Pitx1 et les Irx. En fait, il semble que Irx3 et Irx5 interfèrent avec l'effet activateur de Pitx1. Sur ces trois régions conservées du locus de *Tbx4* testées, l'ajout de Irx3 ou Irx5 soit diminue le niveau de la transcription (Région A, voir **figure 3.4 B**, p. 86), soit ramène le niveau de transcription au niveau initial (Région D, voir **figure 3.4 E**, p. 86) ou diminue le niveau de transcription en deçà du niveau initial (avec Irx5 via la Région B ($p = 0,023$), voir **figure 3.4 C**, p. 86). De plus, bien que

Pitx1 ne semble avoir aucune activité positive sur la transcription via la Région C, l'ajout de la quantité maximale de vecteurs codant pour Irx5 en présence de Pitx1 diminue le niveau d'expression de la luciférase en deçà du niveau initial ($p = 0,007$), (voir **figure 3.4 D**, p. 86). Ces expériences, ainsi que celles utilisant Gal4DBD_CtermPitx1 et un promoteur générique, montrent un antagonisme entre les fonctions de régulation transcriptionnelle des facteurs de transcription Pitx1 et Irx3/5 : les Iroquois interfèrent les capacités d'activation transcriptionnelle de Pitx1, en transfection, dans un système hétérologue.

3.3.2 Rôles convergents de *Pitx1* et *Irx3/Irx5* : régulation de l'expression de *Pax9*

Des travaux de notre collaborateur ont montré l'importance de *Irx3* et *Irx5* pour l'expression de *Pax9* exclusivement dans le bourgeon de membre postérieur. En effet, par hybridation *in situ* sur embryons entiers, on observe la disparition de l'expression de *Pax9* exclusivement au niveau des bourgeons de membre postérieur des embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} à e11,5 alors que l'expression de *Pax9* au niveau des bourgeons de membres antérieurs demeure intacte (voir **figure 1.8 E-F**, p. 61) (C. C. Hui, comm. pers.). Il est encore inconnu si *Pax9* est une cible directe des *Iroquois* dans le bourgeon de membre. Toutefois, la perte exclusive de *Pax9* au niveau des membres postérieurs, malgré l'expression des *Iroquois* dans les deux paires de membres, suggère la participation de facteurs de transcription exclusivement exprimés au niveau des membres postérieurs. Dans l'éventualité d'une interaction fonctionnelle entre les Pitx et les Irx vers un programme génétique de croissance du

bourgeon de membre, nous nous sommes demandé si les *Pitx* participent à la régulation de l'expression de *Pax9* au cours du développement du bourgeon de membre postérieur.

Ainsi, nous avons observé par hybridation *in situ* sur embryons entiers à e11,5 le patron d'expression de *Pax9* chez les embryons doubles hétérozygotes ne présentant aucun phénotype comme contrôles (*Pitx1*^{+/-};*Pitx2*^{+/néo}), les embryons mutants pour *Pitx1* (*Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/néo}) et les embryons doubles mutants (*Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}) (voir **figure 3.5**, p. 90). Chez les embryons contrôles, nous avons retrouvé le patron d'expression connu de *Pax9*, exprimé au niveau du mésenchyme facial, du sclérotome et dans une région précise du bourgeon de membre de forme palmé, restreint du côté antérieur, autant dans les bourgeons antérieurs que postérieurs (voir **figure 3.5 A**, p. 90) (Neubuser et al., 1995). Par contre, chez les embryons mutants pour *Pitx1* comme chez les doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*, nous avons observé, à e11,5, une absence d'expression de *Pax9* exclusive aux membres postérieurs (voir **figure 3.5 F-H, K-M**, p. 90). En effet, l'expression au niveau des membres antérieurs ainsi qu'aux autres sites d'expression n'est pas affectée (voir **figure 3.5 F-G, K-L**, p. 90). L'observation d'une absence d'expression de *Pax9* chez les mutants pour *Pitx1* laisse entendre que *Pitx1* est le principal acteur, devant *Pitx2*, à affecter l'expression de *Pax9* lors du développement des membres postérieurs.

Toutefois, il convient de noter que les mutants pour *Pitx1* et les doubles mutants *Pitx1/Pitx2* présentent un phénotype de retard de croissance des bourgeons

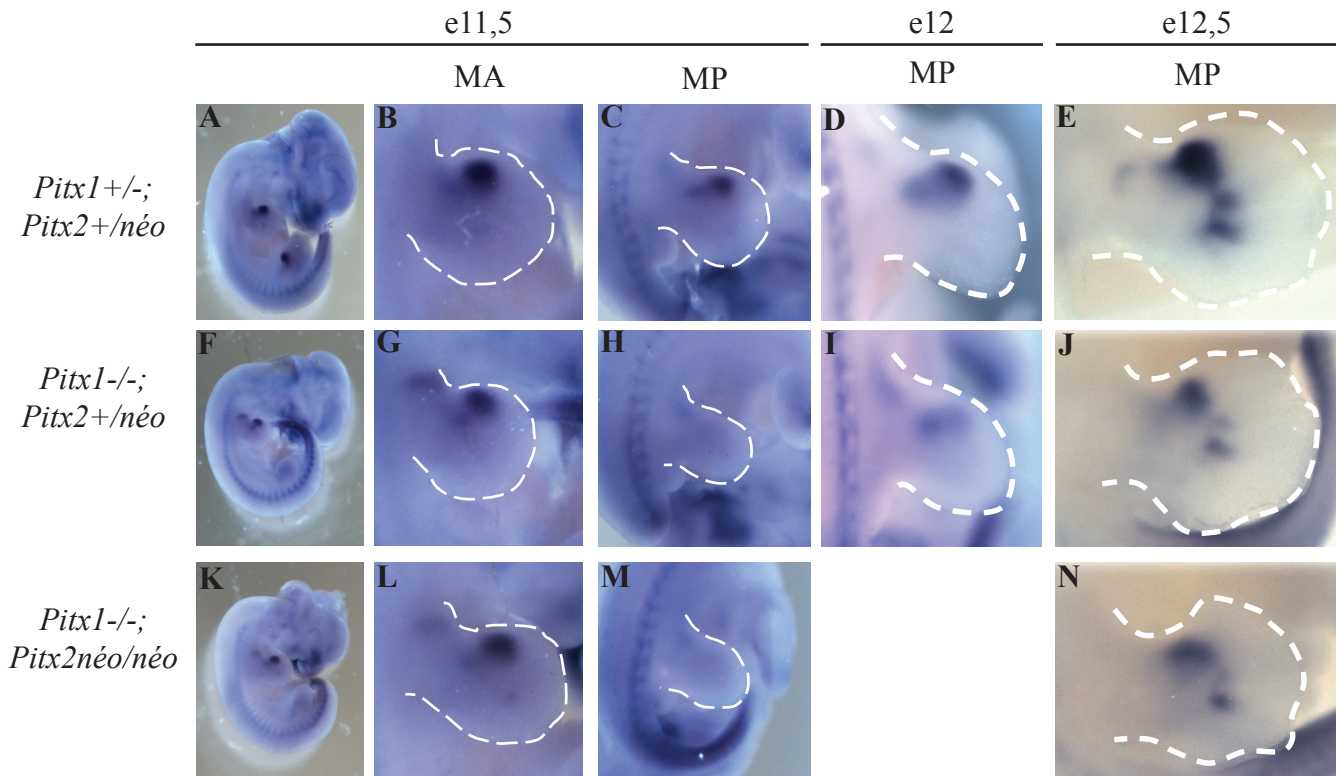


Figure 3.5. Retard et diminution d'expression de *Pax9* exclusivement au niveau du bourgeon de membre postérieur chez les *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/néo} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. Hybridations *in situ* sur embryons entiers (A-N) montrant un retard d'expression de *Pax9* au niveau des bourgeons de membre postérieur (MP) à e11,5 chez les embryons *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/néo} (H) et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} (M) malgré une expression normale au niveau des bourgeons de membre antérieur (MA) (G, L). L'expression de *Pax9* est diminuée au niveau de bourgeons de membre postérieur à e12 (I) et à e12,5 (J, N) chez *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/néo} (I, J) et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} (J, N).

de membres. Comme l'expression de *Pax9* est connue pour apparaître au stade de bourgeon de membre de forme palmée, et que ce développement du bourgeon se produit à e11,5, il se pourrait que la perte d'expression de *Pax9* chez les mutants pour les *Pitx* soit plutôt attribuable à un retard de croissance et non à un rôle direct ou indirect de ces facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de *Pax9*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de compléter notre analyse en observant le profil d'expression de *Pax9* chez les mutants pour les *Pitx* plus tard au cours du développement.

En effet, l'expression de *Pax9* est présente à e12,0 et à e12,5 chez les embryons mutants pour *Pitx1* et les doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*. Toutefois, cette expression est atténuée, bien que la région d'expression demeure intacte. Nous pouvons donc conclure que les facteurs de transcription *Pitx*, tout comme les facteurs *Irx*, jouent un rôle dans l'expression de *Pax9* dans la région antérieure du bourgeon de membre postérieur en développement.

3.4 Conclusions

En somme, la phénocopie observée entre les souris doubles mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2* et les souris *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} ne peut s'expliquer par une cascade d'interrégulation transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx*. En effet, il s'est avéré que les *Pitx* ne sont pas essentiels à l'expression des *Irx* dans le bourgeon de membres postérieurs en développement. L'expression de *Irx3* et *Irx5* dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur est maintenue chez les souris

Pitx1^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo}. Des travaux de notre collaborateur ont réfuté l'hypothèse inverse, soit que les *Irx* dirigent l'expression des *Pitx* dans le bourgeon, puisque l'expression de *Pitx1* est intacte chez les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (C. C. Hui, comm. pers.). Enfin, pour expliquer la phénocopie observée, on peut imaginer que les *Pitx* et les *Irx* agissent de concert sur les mêmes cibles transcriptionnelles lors du développement des bourgeons de membres postérieurs. Tout d'abord, nous avons observé une interaction fonctionnelle entre *Pitx1* et *Irx3/5* en transfection. Premièrement, à l'aide d'un système générique utilisant la protéine de fusion Gal4DBD_CtermPitx1. Ensuite, sur les régions conservées du locus de *Tbx4*, un gène cible de *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur. En fait, les fonctions de régulation transcriptionnelle des *Irx* antagonisent les capacités activatrices de *Pitx1*. D'autre part, il semblerait que les rôles des facteurs *Pitx* et *Irx* convergent lors du développement du bourgeon de membre postérieur puisque les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} ainsi que les embryons *Pitx1*^{-/-} montrent une absence d'expression de *Pax9* spécifiquement au niveau des bourgeons de membres postérieurs à e11,5. Toutefois, l'expression de *Pax9* est présente, bien qu'atténuée, dans la région antérieure des bourgeons de membres postérieurs des embryons mutants pour les *Pitx* à e12 et à e12,5. Ainsi, nous pouvons conclure à une participation des gènes *Pitx* et *Irx* dans la régulation de l'expression de *Pax9* dans le bourgeon de membre postérieur en développement. Ces expériences suggérant une action positive pour les deux facteurs, *Pitx* et *Irx*, ces observations ne peuvent être directement reliées à l'antagonisme transcriptionnel observé entre ceux-ci. Des études plus poussées seraient nécessaires pour résoudre cette apparente discordance.

Chapitre 4

DISCUSSION

Chapitre 4 : Discussion

Le rôle des facteurs de transcription *Pitx1* et *Pitx2* au cours du développement des membres postérieurs a été évalué au moyen de manipulations génétiques chez la souris (Lancôtôt et al., 1999; Marcil et al., 2003; Szeto et al., 1999). *Pitx1* joue un rôle clé dans la détermination de l'identité des membres postérieurs puisque les souris *Pitx1*^{-/-} montrent une transformation partielle des membres postérieurs en membres antérieurs (voir **figure 1.3**, p. 40). De plus, l'expression ectopique de *Pitx1* dans le bourgeon de membre antérieur du poulet confère à celui-ci des caractères propres aux membres postérieurs (Szeto et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Les souris *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} ont démontré l'importance de *Pitx2* dans la croissance du bourgeon de membre postérieur. On observe chez ces mutants un retard de croissance du bourgeon de membre postérieur qui se traduit par une réduction de la taille du bourgeon selon l'axe A/P. Le phénotype résulte en la perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs (Marcil et al., 2003). Nous avons tenté d'explorer les causes de la perte de ces éléments squelettiques en comparant les souris mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2* avec les souris *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-}, présentant elles aussi une aplasie des éléments squelettiques proximaux et antérieurs, spécifiquement au niveau des membres postérieurs (voir **figure 1.4**, p. 44 et **figure 1.7**, p. 60) (C. C. Hui, comm. pers.). La phénocopie entre ces souris doubles mutantes nous a permis de poser plusieurs hypothèses concernant une interaction fonctionnelle entre ces deux familles de gènes. Nous avons d'abord posé l'hypothèse selon laquelle les *Pitx* et les *Irx* font partie d'une cascade d'interrégulation transcriptionnelle dans le bourgeon de

membre postérieur en développement. Nous nous sommes demandé si les facteurs de transcription *Pitx1* et *Pitx2* pouvaient être responsables de l'expression des gènes *Irx3* et *Irx5* dans le bourgeon de membre postérieur. Nous avons vérifié cette hypothèse en regardant le patron d'expression de *Irx3* et *Irx5* chez les souris mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2*. D'autre part, l'expression de *Pitx1* a été étudiée chez les souris mutantes *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} afin de vérifier si les facteurs Iroquois pouvaient être responsables de l'expression des *Pitx* (C.C. Hui, comm. pers.). Ensuite, nous avons voulu vérifier si les facteurs *Pitx* et *Irx* pouvaient participer ensemble à un même programme génétique de croissance du bourgeon de membre postérieur. Nous avons d'abord testé l'interaction transcriptionnelle entre *Pitx1* et *Irx3/5*. Premièrement au moyen d'une protéine de fusion entre Gal4DBD et le domaine C-terminal de *Pitx1* et un gène rapporteur contenant cinq répétitions de l'élément de réponse transcriptionnelle de la protéine Gal4. Puis, avec les protéines natives *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* et les régions conservées du locus de *Tbx4*, gène connu pour être régulé par *Pitx1* dans le bourgeon de membre postérieur (Lanctôt et al., 1999; Szeto et al., 1999). Enfin, nous avons voulu vérifier si un marqueur moléculaire (*Pax9*), connu pour être absent à e11,5 chez les souris mutantes pour *Irx3* et *Irx5*, était aussi modifié chez les mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*. Cette étude nous a permis de conclure d'abord qu'il n'existe pas de cascade d'interrégulation transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx* dans le bourgeon de membre postérieur en développement. Ensuite, que la phénocopie observée entre les doubles mutants *Pitx1/Pitx2* et les doubles mutants *Irx3/Irx5* pourrait s'expliquer par des interactions fonctionnelles entre ces deux paires de facteurs de transcription sur les mêmes cibles transcriptionnelles. En premier lieu, nous avons observé une interaction fonctionnelle entre *Pitx1* et *Irx3* ou *Irx5* autant sur

un promoteur générique que sur les régions conservées d'un gène cible de *Pitx1*. Deuxièmement, nous avons observé que la mutation de *Pitx1/2* comme celle de *Irx3/5* résulte en une absence d'expression de *Pax9* à e11,5 dans le domaine antérieur du bourgeon.

4.1 Les patrons d'expression de *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* se chevauchent dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur

Avant d'investiguer la phénocopie entre les mutants pour *Irx3/5* et les mutants pour *Pitx1/2* et de proposer des hypothèses concernant leurs interrégulations ou leurs interactions fonctionnelles, nous avons en premier lieu observé une superposition des domaines d'expression de *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* au niveau proximal du bourgeon de membre postérieur à e10,5 et dans la région antéroproximale à e11,5 alors que l'expression de *Pitx2* à ces étapes de développement est confinée au mésoderme de la lame latérale adjacent au bourgeon et aux masses musculaires en formation dans le bourgeon (voir **figure 3.1**, p. 76). Le chevauchement des patrons d'expression de *Pitx1* et *Irx3/5* permet d'émettre des hypothèses de coopération et/ou d'interrégulation transcriptionnelles dans ces régions du bourgeon. Toutefois, afin de réellement démontrer la co-expression de *Pitx1*, *Irx3* et *Irx5* dans les cellules de la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur, des co-marquages en immunohistochimie ou en immunofluorescence devraient être faits. Des coupes provenant des souris *Irx3^{LacZ/+}* et des souris *Irx5^{GFP/+}* pourraient être utilisées pour procéder soit à une coloration avec la β -galactosidase et un marquage *Pitx1* en immunohistochimie, soit un marquage *Pitx1* en immunofluorescence et la détection

de la GFP. Ainsi, nous pourrions alors démontrer la co-expression de ces protéines dans les mêmes cellules de la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur en développement.

Il est intéressant de noter que ces régions de chevauchement correspondent aux régions présumées qui formeront les éléments squelettiques affectés qui sont à la base de la phénocopie entre les mutants (Bowen et al., 1989; Vargesson et al., 1997; Saunders, 1948). Il serait d'ailleurs intéressant de procéder à des études de lignage afin de visualiser les éléments squelettiques qui proviennent des régions d'expression des *Pitx* et des *Irx*.

4.2 Étude de la hiérarchie transcriptionnelle entre les *Pitx* et les *Irx* lors du développement du bourgeon de membre postérieur

La phénocopie entre les souris mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2* et les souris *Irx3*^{-/-}; *Irx5*^{-/-} nous a amenés à poser l'hypothèse selon laquelle ces deux paires de facteurs de transcription se régulent l'une l'autre au cours du développement du bourgeon de membre postérieur. Nous n'avons pas observé la perte d'expression des facteurs *Iroquois* chez les souris *Pitx1*^{-/-} et *Pitx1*^{-/-}; *Pitx2*^{néo/néo} (voir **figure 3.2**, p. 80). Par conséquent, nous ne pouvons expliquer le phénotype encouru lors de la perte de *Pitx1* ou de *Pitx1* et *Pitx2* par une absence des facteurs de transcription *Irx* lors du développement du bourgeon de membre postérieur. Nous ne pouvons donc pas placer les facteurs *Pitx* en amont d'une cascade de régulation transcriptionnelle directe ou indirecte conduisant à l'activation de *Irx3/5* dans le mésenchyme proximal

et antérieur du bourgeon. De plus, la transcription de *Pitx1* n'est pas altérée chez les souris *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (C.C. Hui, comm. pers.). Les facteurs *Pitx* et *Irx* ne semblent pas faire partie de cascades transcriptionnelles se régulant les unes, les autres. Afin de déterminer si ces facteurs interagissent au niveau génétique, des croisements devraient être faits afin de produire des souris mutantes pour les deux familles de gènes : *Pitx1*^{-/-};*Irx3*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-};*Irx5*^{+/-} ; *Pitx2*^{néo/néo};*Irx3*^{+/-} et *Pitx2*^{néo/néo};*Irx5*^{+/-} ; *Pitx1*^{+/-};*Irx3*^{-/-} et *Pitx1*^{+/-};*Irx5*^{-/-} ; *Pitx2*^{+ /néo};*Irx3*^{-/-} et *Pitx2*^{+ /néo};*Irx5*^{-/-}. L'étude des phénotypes présentés par ces souris permettrait d'établir si la perte d'allèles des gènes *Iroquois* contribuerait au phénotype des souris mutantes pour les *Pitx* et vice-versa.

4.3 Étude de l'interaction fonctionnelle entre les *Pitx* et les *Irx*

4.3.1 Étude de l'interaction transcriptionnelle entre *Pitx1* et *Irx3/5*

4.3.1.1 Essais transcriptionnels avec une protéine de fusion entre le domaine activateur de *Pitx1* et le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 et *Irx3/Irx5* sur un promoteur générique (5XUAS)

Nous avons choisi de tester les capacités de coopération transcriptionnelle des facteurs de transcription *Pitx1/2* et *Irx3/5* en transfection transitoire au moyen de la protéine de fusion Gal4DBD_Cterm*Pitx1* et du gène rapporteur contenant cinq répétitions de l'élément de réponse de Gal4. Nous avons choisi cette expérience afin de spécifier l'interaction de la protéine Gal4DBD_Cterm*Pitx1* avec le gène

rapporteur indépendamment de la protéine Pitx1 endogène dans le système. De plus, dans cette expérience, nous nous assurons de tester la coopération entre la région C-terminale de Pitx1 et les protéines Irx3/5.

Les résultats obtenus ont confirmé les capacités activatrices de la région C-terminale de Pitx1, capable d'augmenter la transcription du gène rapporteur d'un facteur d'environ 14 fois (voir **figure 3.3 E**, p. 83). De plus, nous avons pu observer un antagonisme fonctionnel entre Pitx1 et Irx3/5. En effet, l'ajout de Irx3 ou Irx5 dans ces transfections a montré une répression des capacités d'activation transcriptionnelle de la région C-terminale de Pitx1 (voir **figure 3.3 F-G**, p. 83). Ceci laisse donc entendre que Pitx1 et les facteurs Iroquois peuvent interagir transcriptionnellement sur un promoteur générique dans un système *in vitro*.

L'expérience inverse devrait être faite afin de vérifier si la liaison forcée des facteurs Iroquois à l'ADN peut entraîner une interaction fonctionnelle positive avec Pitx1. Des protéines de fusion entre Gal4DBD et Irx3/5 pourraient être construites afin de vérifier si la liaison à l'ADN de Irx3/5 mènerait à une coopération avec Pitx1 lors de la régulation de la transcription.

4.3.1.2 Essais transcriptionnels avec Pitx1 et Irx3/Irx5 sur les régions conservées du locus de *Tbx4*

Il se peut qu'une interaction transcriptionnelle entre Pitx1 et Irx3/5 passe par la liaison de chacun de ces facteurs au promoteur et soit affectée par le contexte génétique du promoteur. Comme aucun gène cible n'est encore attribué aux facteurs Iroquois dans le bourgeon de membre, nous avons testé l'interaction entre Pitx1 et Irx3/5 sur les régions conservées du locus de *Tbx4*, gène régulé par Pitx1 au cours du développement du bourgeon de membre postérieur. En effet, l'expression de *Tbx4* est diminuée chez les souris déficientes en *Pitx1* (Lanctôt et al., 1999; Szeto et al., 1999). De plus, la surexpression de *Pitx1* au niveau de membres antérieurs de poulet conduit à une surexpression de *Tbx4* dans ces derniers alors que son expression y est normalement réfrénée (Ohuchi et al., 1998; Rodriguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Szeto et al., 1999). Des régions conservées inter-espèces du locus de *Tbx4* et contenant des sites de liaison de Pitx1 ont été identifiées (Dumontier, 2005; Menke et al., 2008). Bien que chacune de ces régions contienne des sites de liaison pour Pitx1, elles ne répondent pas toutes à des doses croissantes de vecteurs codant pour Pitx1 en transfection. Nous avons néanmoins testé chacune de ces régions pour une interaction fonctionnelle possible entre Pitx1 et les facteurs Iroquois. Sur les régions du locus de *Tbx4* répondant à des doses croissantes de Pitx1, l'ajout de Irx3 ou Irx5 entraîne une suppression de l'activité de Pitx1, comme dans le système générique avec la protéine de fusion Gal4DBD_CtermPitx1 (voir **figure 3.3**, p. 83 et **figure 3.4**, p. 86). Il s'avère donc que dans le contexte d'un gène connu pour être

régulé par Pitx1, l'activité des facteurs Iroquois interfère aussi l'effet activateur de Pitx1.

Cependant, cette interférence des capacités activatrices de Pitx1, que ce soit sur le promoteur générique ou via les régions conservées du locus de Tbx4, peut résulter d'un effet de titration des co-facteurs de Pitx1 par les facteurs Iroquois. En effet, en ajoutant les facteurs Iroquois dans ces transfections, ceux-ci, sans participer directement à la régulation de la transcription de la luciférase, pourraient interagir avec les co-facteurs activateurs nécessaires à Pitx1 en les retirant du complexe de régulation de la transcription de la luciférase, résultant en une baisse des capacités d'activation de Pitx1. Toutefois, des résultats préliminaires ont montré l'interaction entre les facteurs Pitx et les Iroquois à l'intérieur d'un même complexe protéique par des co-immunoprécipitations sur des cellules de bourgeons de membres postérieurs en développement (C. C. Hui, comm. pers.). Ainsi, il est tout à fait plausible que les facteurs Pitx et Irx interagissent fonctionnellement *in vivo* dans le bourgeon de membre postérieur lors de son développement.

La phénocopie observée entre les mutants pour les *Pitx* et ceux pour les *Irx* suppose une synergie activatrice entre les facteurs Pitx et Irx. Bien que dans chacune de ces expériences nous ayons observé un antagonisme entre les fonctions transcriptionnelles de Pitx1 et Irx3/5, il est possible que ces derniers activent les mêmes cibles transcriptionnelles dans le bourgeon de membre postérieur en développement. En effet, la présence de co-facteurs spécifiques peut être requise pour l'observation d'une interaction fonctionnelle positive entre Pitx1 et les facteurs

Iroquois, co-facteurs spécifiques qui sont peut-être absents du système hétérologue utilisé, c'est-à-dire les cellules COS. Les transfections pourraient donc être reproduites dans un système de culture primaire de cellules de bourgeons de membres postérieurs, système qui posséderait ces co-facteurs nécessaires et qui serait plus fidèle à la situation *in vivo*.

D'un autre côté, on peut penser que les facteurs Pitx et Irx sont nécessaires à la régulation de l'expression de gènes particuliers dans la région antéroproximale du bourgeon de membre postérieur en développement. Ainsi, l'antagonisme de l'effet activateur de Pitx1 par les Irx dans cette région d'expression serait nécessaire à la répression de l'expression de ces gènes dans la région antéroproximale du bourgeon et expliquerait la phénocopie observée entre les mutants pour les *Pitx* et ceux pour les *Irx*. En effet, en absence soit des *Pitx* soit des *Irx*, l'expression de ces gènes ne pourrait pas être réfrénée, ce qui conduirait au phénotype observé et à la phénocopie entre les mutants.

4.3.2 Rôles convergents de *Pitx1* et *Irx3/Irx5* : régulation de l'expression de *Pax9*

Les cascades génétiques régulées par les facteurs de transcription *Pitx1/2* et *Irx3/5* semblent toutes deux converger vers un même programme génétique puisque leur ablation cause, indépendamment l'une de l'autre, la perte d'expression du marqueur du mésenchyme antérieur *Pax9*. En effet, nous avons observé l'absence d'expression de *Pax9* chez les souris *Pitx1*^{-/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo} à e11,5 (voir

figure 3.5 H, M, p. 90) comme cela a été montré chez les souris *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (voir **figure 1.8 E, F**, p. 61). Par contre, l'expression de *Pax9* est présente, bien qu'atténuée, à e12,0 et e12,5, chez les mutants pour *Pitx1* ainsi que les doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2* (voir **figure 3.5 I, J, N**, p. 90). Ainsi, nous pouvons conclure à un retard d'expression de *Pax9* chez les embryons mutants pour les *Pitx*. De plus, cette expression est atténuée plus tard au cours du développement du bourgeon, démontrant l'importance des *Pitx* dans la régulation de l'expression de *Pax9*. Il serait par conséquent intéressant de vérifier l'expression de *Pax9* chez les embryons mutants pour les *Iroquois* à un stade plus avancé de développement. En effet, il se pourrait qu'on soit en présence d'un retard d'expression de *Pax9* chez ceux-ci, et non devant une perte d'expression.

Les éléments squelettiques atteints par la perte de *Pitx1/2* ou *Irx3/5* sont tous des éléments proximaux et antérieurs : le fémur, le tibia et le doigt #1 (voir **figure 1.4**, p. 44 et **figure 1.7**, p. 60). Il semble donc que la régulation de *Pax9* au niveau du mésenchyme antérieur du bourgeon en croissance soit une clef importante permettant de comprendre l'implication de *Pitx1/2* et de *Irx3/5* au développement du bourgeon. Contre nos attentes, la seule inactivation de *Pitx1* suffit pour observer un retard d'expression de *Pax9*, alors que la phénocopie s'observe avec les souris mutantes pour *Pitx1* et *Pitx2*. Ceci suggère donc que *Pitx1* est un acteur majeur, par rapport à *Pitx2*, dans la régulation de l'expression de *Pax9*.

Pax9 étant exprimé antérieurement, sa répression pourrait être, au moins en partie, responsable du phénotype des mutants pour les *Pitx* et des mutants pour les

Irx. Cependant, le phénotype encouru par l'inactivation génétique de *Pax9* est difficilement réconciliable avec les phénotypes des souris *Pitx1*^{-/-}, *Pitx1*^{-/-}; *Pitx2*^{néo/néo} et *Irx3*^{-/-}; *Irx5*^{-/-} (voir **figure 1.4**, p. 44 et **figure 1.7**, p. 60). Plutôt que de présenter une phénocopie, du moins partielle, avec les mutants pour les *Pitx* et ceux pour les *Irx*, les membres des souris *Pax9*^{-/-} sont caractérisés par une augmentation des condensations cartilagineuses au niveau du genou et des métacarpes/métatarses et par la formation d'un doigt ^{#1} surnuméraire (Peters et al., 1998). Ce phénotype semble à priori à l'opposé de la perte des éléments squelettiques proximaux et antérieurs des mutants pour les *Pitx* et les *Irx*. Les auteurs ont expliqué ce phénotype par la nécessité de l'expression de *Pax9* pour la restriction de la population exprimant *Pax9* dans la région antérieure du bourgeon. Son inactivation résulte en une prolifération cellulaire de cette population, qui se condensera par la suite pour former des cartilages ectopiques. Ceci est à l'opposé du phénotype engendré lors de l'inactivation des *Pitx* ou des *Iroquois*. Par conséquent, il semble que *Pax9* soit un marqueur moléculaire permettant d'observer le développement du bourgeon de membre postérieur des deux doubles mutants plutôt qu'un acteur déterminant dans l'obtention du phénotype observé.

4.3.2.1 Régulation de l'expression des BMPs par les *Pitx* et les *Irx*

Comme mentionnée précédemment (voir **section 1.5.1**, p. 65), la restriction des domaines d'expression de *Pax1*, et possiblement de *Pax9*, est régulée par la signalisation de la voie des BMPs. En effet, l'application de billes trempées dans *Bmp2* et/ou *Bmp4* dans le domaine d'expression de *Pax1* ou *Pax9* avant l'induction

de leur expression suffit à réfréner leur expression (Hofmann et al., 1998; McGlinn et al., 2005). Or, des données recueillies au laboratoire ont montré que la transcription de *Bmp7* est suractivée dans tout le bourgeon de membre postérieur de la souris *Pitx1*^{-/-} (voir **figure 4.1 A**, p. 106). Ces données permettent alors de poser l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la signalisation par la voie des Bmps dans le bourgeon de *Pitx1*^{-/-} serait la cause du retard et de la diminution d'expression de *Pax9* au niveau antérieur du bourgeon. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait d'abord observer l'expression de *Bmp7* à e11,5, stade durant lequel l'expression de *Pax9* est activée. Ensuite, nous devrions observer l'expression des autres *Bmps* exprimés dans le mésenchyme du bourgeon de membre postérieur, *Bmp2* et *Bmp4*, chez les souris mutantes pour les *Pitx*.

Les souris mutantes pour *Irx3* et *Irx5* présentent aussi la perte de l'expression de *Pax1* en plus de celle de *Pax9* au niveau des bourgeons de membres postérieurs (voir **figure 1.8 D**, p. 61). Comme ce domaine d'expression est restreint par les BMPs, il est important que l'expression de *Pax1* soit investiguée chez les mutants pour *Pitx1* et les mutants pour *Pitx1* et *Pitx2*. Comme les embryons *Pitx1*^{-/-} présentent une augmentation de l'expression de *Bmp7* dès e10,5, on peut penser que ceux-ci présenteront une perte d'expression de *Pax1*.

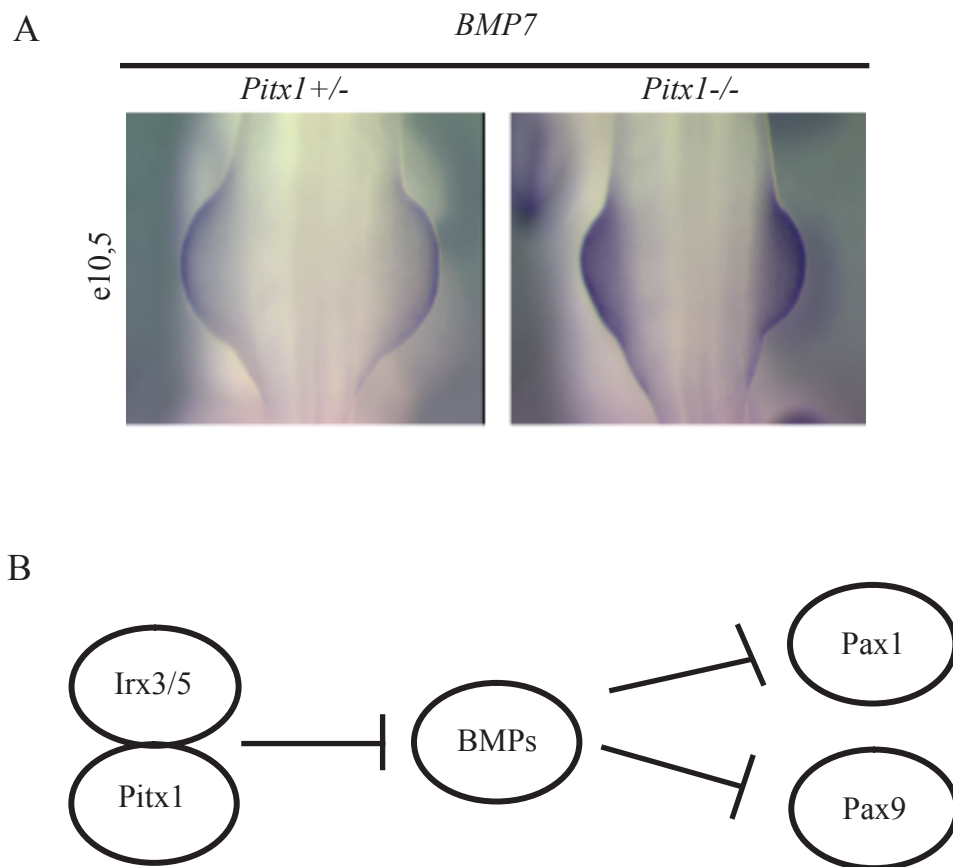


Figure 4.1 Augmentation de l'expression de *Bmp7* dans le bourgeon de membre postérieur des embryons *Pitx1*^{-/-} et modèle de travail. Hybridations *in situ* sur embryons entiers montrant une augmentation de l'expression de *Bmp7* dans le bourgeon de membre postérieur des embryons *Pitx1*^{-/-} en comparaison aux embryons de type sauvage à e10,5 (A) (A. Marcil, données non-publiées). Modèle de travail : *Pitx1*, possiblement en coopération avec les facteur Iroquois, restreint l'expression des *Bmps* dans le bourgeon de membre postérieur en développement, ce qui permet l'expression des gènes *Pax1* et *Pax9* dans la région antérieure du bourgeon (B).

4.3.2.1.1 Première hypothèse : Régulation directe des BMPs par les Pitx et les Irx

À partir de ceci, nous pouvons proposer l'hypothèse selon laquelle les Pitx et les Irx participent de concert à la répression de la transcription des BMPs dans le bourgeon de membre postérieur en développement (voir **figure 4.1 B**, p. 106), ce qui expliquerait la phénocopie observée entre les souris mutantes pour les *Pitx* et celles mutantes pour les *Irx*. Afin de valider cette hypothèse, nous devrions commencer, comme mentionné précédemment, par des hybridations *in situ* pour vérifier le niveau d'expression de *Bmp2* et *Bmp4* chez les embryons mutants pour *Pitx1*. Ensuite, pour confirmer la participation des *Irx* dans la régulation de la transcription des BMPs, des hybridations *in situ* montrant l'expression de *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7* devraient être faites chez les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-}.

4.3.2.1.2 Deuxième hypothèse : Régulation indirecte des BMPs par les Pitx et les Irx

Les souris mutantes pour *Pitx1* ou pour *Pitx1* et *Pitx2* présentent un phénotype de croissance du bourgeon de membre postérieur selon l'axe A/P (voir **figure 1.4 K-P**, p. 44) (Marcil et al., 2003). De la même façon, les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} montrent aussi un amincissement du bourgeon de membre postérieur selon l'axe A/P (voir **figure 1.8 B, D**, p. 61 et **figure 4.2 D, H**, p. 108).

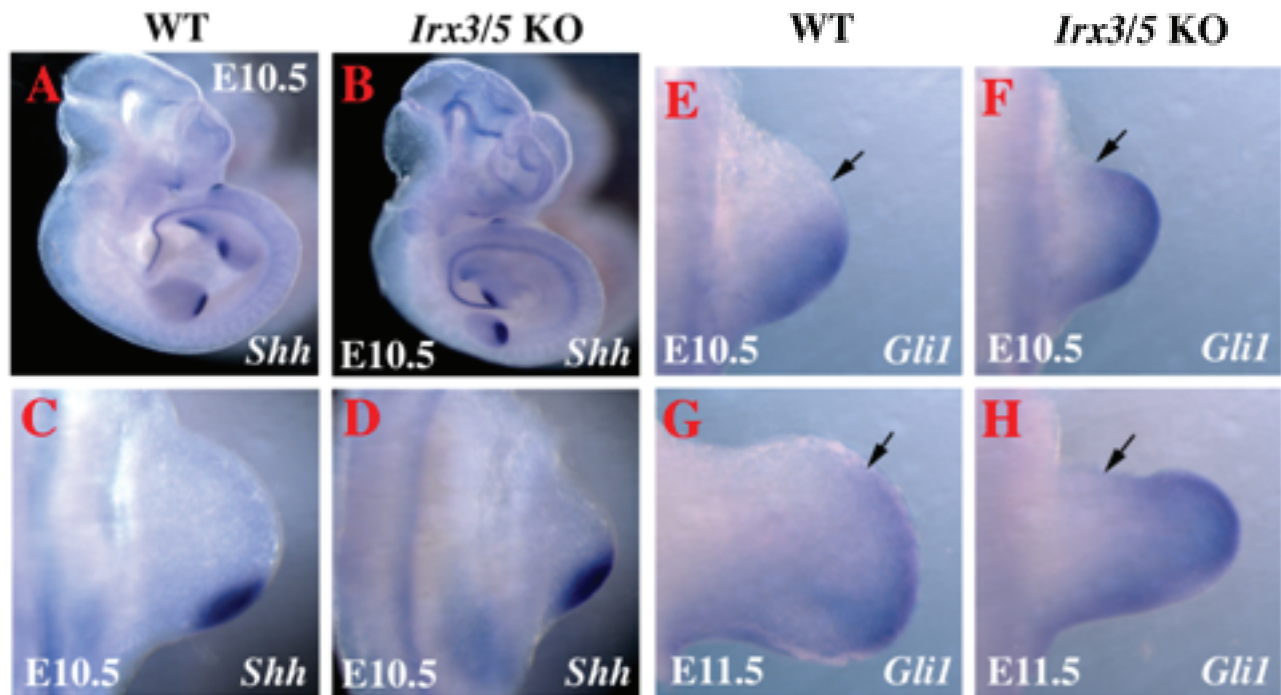


Figure 4.2. Maintien de l'expression de *Shh* et déplacement de la limite d'expression de *Gli1* chez les embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-}. Hybridations *in situ* sur embryons entiers montrant le maintien du domaine d'expression de *Shh* malgré une diminution de la taille du bourgeon de membre postérieur à e10,5 chez *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (B, D) en comparaison aux embryons de type sauvage (A, C). Hybridations *in situ* sur embryons entiers montrant le déplacement vers l'antérieur de la limite d'expression de *Gli1*, un gène cible de la signalisation par *Shh*, à e10,5 et à e11,5, dans le bourgeon de membre postérieur des embryons *Irx3*^{-/-};*Irx5*^{-/-} (F, H) en comparaison aux bourgeons de membres postérieurs des embryons de type sauvage (E, G). (Avec permission de C. C. Hui, Université de Toronto, résultats non-publiés).

Shh est exprimé dans la région distale du mésenchyme postérieur du bourgeon d'où il diffuse pour transmettre l'activation de la transcription de gènes cibles tels que *Patched (Ptc)*, *Gli1* et *Bmp2/7* (Laufer et al., 1994; Yang et al., 1997). De plus, la signalisation par *Shh* empêche la protéine Gli3 de procéder à un autoclivage qui la transforme d'un activateur transcriptionnel en un répresseur transcriptionnel (Goodrich et al., 1996). Le mésenchyme du bourgeon de membre présente donc un gradient des formes activatrice/répressive de Gli3 selon l'axe allant du postérieur vers l'antérieur.

Comme les bourgeons de membres postérieurs des mutants pour les *Pitx* ainsi que ceux des mutants *Irx3^{-/-};Irx5^{-/-}* présentent une taille réduite selon l'axe A/P tandis que le domaine d'expression de *Shh* demeure intact (voir **figure 4.2 A-D**, p. 108), la signalisation via *Shh* devrait parcourir une plus grande proportion du territoire du bourgeon selon l'axe A/P. Dans ce cas, on devrait retrouver l'activation de la transcription des gènes cibles de *Shh* jusqu'à une limite déplacée vers l'antérieur selon la taille totale du bourgeon. Les bourgeons des membres postérieurs des mutants *Irx3^{-/-};Irx5^{-/-}* montrent effectivement que l'expression de *Gli1* atteint une limite plus antérieure que chez les embryons de type sauvage (voir **figure 4.2 E-H**, p. 108). Le patron d'expression de *Ptc* devrait aussi être observé afin de conforter notre hypothèse. Des hybridations *in situ* des gènes *Ptc* et *Gli1* devraient aussi être faites sur les mutants *Pitx1^{-/-}* et les doubles mutants pour *Pitx1* et *Pitx2* afin de valider notre hypothèse chez ceux-ci.

Comme l'expression de *Bmp2* et de *Bmp7* est aussi activée par la signalisation via *Shh*, on peut penser que leur expression atteindrait aussi une limite déplacée vers l'antérieur du bourgeon. Des données recueillies au laboratoire abondent en ce sens puisque la transcription de *Bmp7* est suractivée dans tout le bourgeon de membre postérieur de la souris *Pitx1*^{-/-} (voir **figure 4.1 A**, p. 106). Il faudrait renforcer cette hypothèse en vérifiant les patrons d'expression de *Bmp2* et de *Bmp7* chez les doubles mutants pour *Irx3* et *Irx5*.

Comme il a été démontré que l'application de billes trempées dans les Bmps pouvait réprimer l'expression de *Pax1* et de *Pax9* dans le bourgeon de membre en développement, on peut poser l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la transcription de *Bmp7* dans le bourgeon de *Pitx1*^{-/-} serait la cause de la perte d'expression de *Pax9* au niveau antérieur du bourgeon.

Afin d'établir fermement que cette surexpression de *Bmp7* chez les mutants pour les *Pitx* participe au phénotype observé, on pourrait croiser les souris mutantes pour les *Pitx* avec celles mutantes pour *Bmp7* (Dudley et al., 1995) afin d'obtenir les souris *Pitx1*^{-/-};*Bmp7*^{+/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo};*Bmp7*^{+/-} ainsi que les souris *Pitx1*^{-/-};*Bmp7*^{-/-} et *Pitx1*^{-/-};*Pitx2*^{néo/néo};*Bmp7*^{-/-}. Si une atténuation ou l'inactivation de la signalisation par *Bmp7*, dans un contexte d'inactivation des *Pitx*, permet de secourir le phénotype normalement observé chez les mutants pour les *Pitx*, nous pourrions alors conclure que la surexpression de *Bmp7* observée chez ces mutants participe effectivement au phénotype.

D'un autre côté, il a été démontré que l'inactivation génétique de *Gli3* résulte aussi en la perte de l'expression de *Pax9* dans la région antérieure du bourgeon de membre, selon un gradient allélique. L'hétérozygote montre une réduction de l'expression de *Pax9* alors que l'homozygote perd complètement cette expression (voir **figure 4.3**, p. 112) (McGlenn, E. et al., 2005). En plus de contribuer à une surexpression des Bmps, un déplacement vers l'antérieur de la limite de signalisation par *Shh* transformerait le gradient Gli3R/Gli3A dans le bourgeon de membre. Ainsi, une réduction de la forme répressive de Gli3 dans le bourgeon des embryons mutants pour les *Pitx* peut aussi contribuer, d'une façon indirecte, à la perte d'expression de *Pax9*.

En somme, la réduction de l'expression de *Pax9* chez les embryons mutants pour les *Pitx* et ceux mutants pour les *Irx* pourrait résulter autant d'une surexpression des Bmps ou d'une réduction de la forme répressive de Gli3, tous deux attribuables à une augmentation de la signalisation par *Shh* en raison d'un défaut de croissance du bourgeon selon l'axe A/P. Par ailleurs, les phénotypes des souris *Irx3^{-/-};Irx5^{-/-}* et *Pitx1^{-/-};Pitx2^{néo/néo}* sont grandement semblables à celui résultant de l'inactivation conditionnelle de *Tbx4* à e10,5 par l'utilisation du transgène *Rosa-ERcre^{T2}* (Naiche and Papaioannou, 2007). L'inactivation de *Tbx4* après l'induction de son expression cause un défaut de croissance du bourgeon de membre postérieur selon l'axe A/P attribué à un défaut d'expression de *Fgf8* dans le domaine antérieur de l'AER. Ce défaut de croissance provoque un déplacement vers l'antérieur du bourgeon de la limite de signalisation par *Shh*, observée à l'aide de l'expression des gènes *Ptc* et *dHand*, ce qui vient conforter nos hypothèses. Il serait par conséquent intéressant de

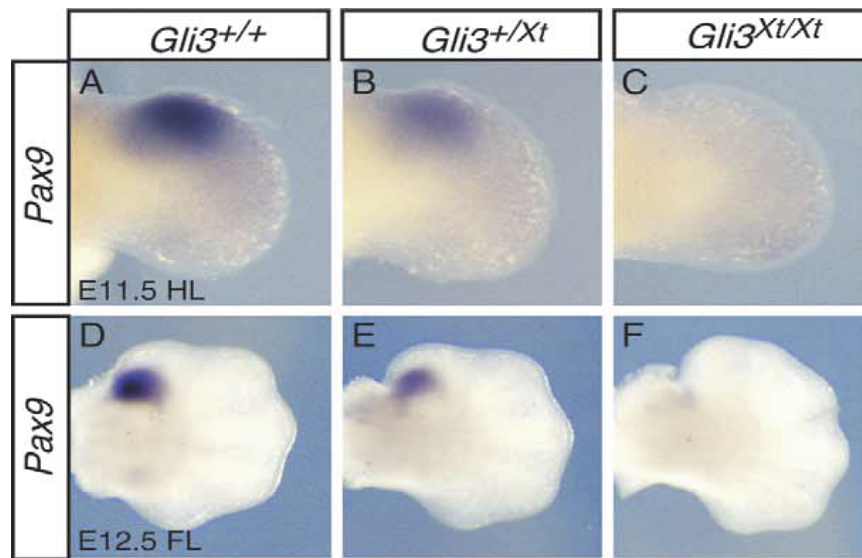


Figure 4.3. Perte d'expression de *Pax9* avec la perte d'allèles codant pour *Gli3*. Hybridations *in situ* sur embryons entiers montrant la diminution de l'expression de *Pax9* dans la région antérieure du bourgeon de membre postérieur à e11,5 (A, B, C) et dans la région antérieure du bourgeon de membre antérieur à e12,5 (D, E, F) chez l'hétérozygote *Gli3*^{+/*Xt*} (B, E) et l'homozygote *Gli3*^{*Xt/Xt*} (C, F) en comparaison aux bourgeons des embryons de type sauvage (A, D). (Figures tirées de McGlinn, P. et al., *Mech. Dev.*, 2005).

vérifier si ces embryons présentent un retard et une réduction de l'expression de *Pax9* ainsi qu'une surexpression de *Bmp7* comme les embryons *Pitx1*^{-/-}.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Agarwal,P., Wylie,J.N., Galceran,J., Arkhitko,O., Li,C., Deng,C., Grosschedl,R., and Bruneau,B.G. (2003). Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* 130, 623-633.
- Agulnik,S.I., Garvey,N., Hancock,S., Ruvinsky,I., Chapman,D.L., Agulnik,I., Bollag,R., Papaioannou,V., and Silver,L.M. (1996). Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics* 144, 249-254.
- Ahn,K., Mishina,Y., Hanks,M.C., Behringer,R.R., and Crenshaw,E.B., III (2001). BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* 128, 4449-4461.
- Altabef,M., Clarke,J.D., and Tickle,C. (1997). Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 124, 4547-4556.
- Amendt,B.A., Semina,E.V., and Alward,W.L. (2000). Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1652-1666.
- Amendt,B.A., Sutherland,L.B., Semina,E.V., and Russo,A.F. (1998). The molecular basis of Rieger syndrome. Analysis of Pitx2 homeodomain protein activities. *J. Biol. Chem.* 273, 20066-20072.
- Arakawa,H., Nakamura,T., Zhadanov,A.B., Fidanza,V., Yano,T., Bullrich,F., Shimizu,M., Blechman,J., Mazo,A., Canaani,E., and Croce,C.M. (1998). Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4573-4578.
- Balling,R., Deutsch,U., and Gruss,P. (1988). undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1. *Cell* 55, 531-535.
- Banerjee-Basu,S. and Baxevanis,A.D. (2001). Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 29, 3258-3269.
- Bao,Z.Z., Bruneau,B.G., Seidman,J.G., Seidman,C.E., and Cepko,C.L. (1999). Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science* 283, 1161-1164.
- Barrow,J.R., Thomas,K.R., Boussadia-Zahui,O., Moore,R., Kemler,R., Capecchi,M.R., and McMahon,A.P. (2003). Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev.* 17, 394-409.

Basson,C.T., Bachinsky,D.R., Lin,R.C., Levi,T., Elkins,J.A., Soultz,J., Grayzel,D., Kroumpouzou,E., Traill,T.A., Leblanc-Straceski,J., Renault,B., Kucherlapati,R., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat. Genet.* *15*, 30-35.

Bell,S.M., Schreiner,C.M., Waclaw,R.R., Campbell,K., Potter,S.S., and Scott,W.J. (2003). Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 12195-12200.

Bellefroid,E.J., Kobbe,A., Gruss,P., Pieler,T., Gurdon,J.B., and Papalopulu,N. (1998). Xiro3 encodes a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois genes and functions in neural specification. *EMBO J.* *17*, 191-203.

Berggren,K., McCaffery,P., Drager,U., and Forehand,C.J. (1999). Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, RALDH-2. *Dev. Biol.* *210*, 288-304.

Bilioni,A., Craig,G., Hill,C., and McNeill,H. (2005). Iroquois transcription factors recognize a unique motif to mediate transcriptional repression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 14671-14676.

Bongers,E.M., Duijf,P.H., van Beersum,S.E., Schoots,J., Van,K.A., Burckhardt,A., Hamel,B.C., Losan,F., Hoefsloot,L.H., Yntema,H.G., Knoers,N.V., and van,B.H. (2004). Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *74*, 1239-1248.

Bosse,A., Stoykova,A., Nieselt-Struwe,K., Chowdhury,K., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Gruss,P. (2000). Identification of a novel mouse Iroquois homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse Iroquois gene family. *Dev. Dyn.* *218*, 160-174.

Bosse,A., Zulch,A., Becker,M.B., Torres,M., Gomez-Skarmeta,J.L., Modolell,J., and Gruss,P. (1997). Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. *Mech. Dev.* *69*, 169-181.

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

Bowen,J., Hinchliffe,J.R., Horder,T.J., and Reeve,A.M. (1989). The fate map of the chick forelimb-bud and its bearing on hypothesized developmental control mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)* *179*, 269-283.

Bruneau,B.G., Bao,Z.Z., Tanaka,M., Schott,J.J., Izumo,S., Cepko,C.L., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (2000). Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev. Biol.* *217*, 266-277.

Burglin,T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 25, 4173-4180.

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

Capdevila,J., Tsukui,T., Rodriguez-Esteban,C., Zappavigna,V., and Izpisua Belmonte,J.C. (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor *Meis2* and distal antagonism of BMPs by *Gremlin*. *Mol. Cell* 4, 839-849.

Chalepakis,G., Fritsch,R., Fickenscher,H., Deutsch,U., Goulding,M., and Gruss,P. (1991). The molecular basis of the undulated/*Pax-1* mutation. *Cell* 66, 873-884.

Chapman,D.L., Garvey,N., Hancock,S., Alexiou,M., Agulnik,S.I., Gibson-Brown,J.J., Cebra-Thomas,J., Bollag,R.J., Silver,L.M., and Papaioannou,V.E. (1996). Expression of the T-box family genes, *Tbx1-Tbx5*, during early mouse development. *Dev. Dyn.* 206, 379-390.

Charite,J., McFadden,D.G., and Olson,E.N. (2000). The bHLH transcription factor *dHAND* controls *Sonic hedgehog* expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127, 2461-2470.

Chen,D., Zhao,M., and Mundy,G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233-241.

Chen,H. and Johnson,R.L. (1999). Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: a process governed by multiple events. *Cell Tissue Res.* 296, 67-73.

Chen,H., Lun,Y., Ovchinnikov,D., Kokubo,H., Oberg,K.C., Pepicelli,C.V., Gan,L., Lee,B., and Johnson,R.L. (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 51-55.

Chiang,C., Litingtung,Y., Harris,M.P., Simandl,B.K., Li,Y., Beachy,P.A., and Fallon,J.F. (2001). Manifestation of the limb prepatterning: limb development in the absence of *sonic hedgehog* function. *Dev. Biol.* 236, 421-435.

Chiang,C., Litingtung,Y., Lee,E., Young,K.E., Corden,J.L., Westphal,H., and Beachy,P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* 383, 407-413.

Christoffels,V.M., Keijser,A.G., Houweling,A.C., Clout,D.E., and Moorman,A.F. (2000). Patterning the embryonic heart: identification of five mouse *Iroquois* homeobox genes in the developing heart. *Dev. Biol.* 224, 263-274.

Chuang,P.T. and McMahon,A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.

Cohen,D.R., Cheng,C.W., Cheng,S.H., and Hui,C.C. (2000). Expression of two novel mouse Iroquois homeobox genes during neurogenesis. *Mech. Dev.* 91, 317-321.

Cohn,M.J. (2000). Developmental biology. Giving limbs a hand. *Nature* 406, 953-954.

Cohn,M.J., Izpisua-Belmonte,J.C., Abud,H., Heath,J.K., and Tickle,C. (1995). Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80, 739-746.

Colvin,J.S., White,A.C., Pratt,S.J., and Ornitz,D.M. (2001). Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 128, 2095-2106.

Corson,L.B., Yamanaka,Y., Lai,K.M., and Rossant,J. (2003). Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* 130, 4527-4537.

Coulon,V., L'Honore,A., Ouimette,J.F., Dumontier,E., van den,M.P., and Drouin,J. (2007). A muscle-specific promoter directs Pitx3 gene expression in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 282, 33192-33200.

Cox,C.J., Espinoza,H.M., McWilliams,B., Chappell,K., Morton,L., Hjalt,T.A., Semina,E.V., and Amendt,B.A. (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 25001-25010.

Crossley,P.H. and Martin,G.R. (1995). The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo. *Development* 121, 439-451.

Cygan,J.A., Johnson,R.L., and McMahon,A.P. (1997). Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development* 124, 5021-5032.

Dambly-Chaudiere,C. and Leyns,L. (1992). The determination of sense organs in *Drosophila*: a search for interacting genes. *Int. J. Dev. Biol.* 36, 85-91.

Davis,C.A., Holmyard,D.P., Millen,K.J., and Joyner,A.L. (1991). Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. *Development* 111, 287-298.

de Luca,C., Kowalski,T.J., Zhang,Y., Elmquist,J.K., Lee,C., Kilimann,M.W., Ludwig,T., Liu,S.M., and Chua,S.C., Jr. (2005). Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J. Clin. Invest* 115, 3484-3493.

Dealy,C.N., Roth,A., Ferrari,D., Brown,A.M., and Kosher,R.A. (1993). Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech. Dev.* *43*, 175-186.

Deutsch,U., Dressler,G.R., and Gruss,P. (1988). Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* *53*, 617-625.

Dietrich,S. and Gruss,P. (1995). undulated phenotypes suggest a role of Pax-1 for the development of vertebral and extravertebral structures. *Dev. Biol.* *167*, 529-548.

Dreyer,S.D., Zhou,G., Baldini,A., Winterpacht,A., Zabel,B., Cole,W., Johnson,R.L., and Lee,B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* *19*, 47-50.

Drouin,J., Lamolet,B., Lamonerie,T., Lanctot,C., and Tremblay,J.J. (1998). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments. *Mol. Cell Endocrinol.* *140*, 31-36.

Ducy,P. and Karsenty,G. (2000). The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* *57*, 2207-2214.

Dudley,A.T., Lyons,K.M., and Robertson,E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* *9*, 2795-2807.

Dumontier, E. Rôles des gènes Pitx dans le développement des membres postérieurs : régulation transcriptionnelle de Tbx4. 2005. Montréal, Université de Montréal. Ref Type: Thesis/Dissertation

Faham,S., Hileman,R.E., Fromm,J.R., Linhardt,R.J., and Rees,D.C. (1996). Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* *271*, 1116-1120.

Fallon,J.F., Lopez,A., Ros,M.A., Savage,M.P., Olwin,B.B., and Simandl,B.K. (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* *264*, 104-107.

Feldman,B., Poueymirou,W., Papaioannou,V.E., DeChiara,T.M., and Goldfarb,M. (1995). Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* *267*, 246-249.

Fernandez-Teran,M., Piedra,M.E., Kathiriya,I.S., Srivastava,D., Rodriguez-Rey,J.C., and Ros,M.A. (2000). Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* *127*, 2133-2142.

Francis,P.H., Richardson,M.K., Brickell,P.M., and Tickle,C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* *120*, 209-218.

Francis-West,P.H., Robertson,K.E., Ede,D.A., Rodriguez,C., Izpisua-Belmonte,J.C., Houston,B., Burt,D.W., Gribbin,C., Brickell,P.M., and Tickle,C. (1995). Expression of genes encoding bone morphogenetic proteins and sonic hedgehog in talpid (ta3) limb buds: their relationships in the signalling cascade involved in limb patterning. *Dev. Dyn.* *203*, 187-197.

Funayama,N., Sato,Y., Matsumoto,K., Ogura,T., and Takahashi,Y. (1999). Coelom formation: binary decision of the lateral plate mesoderm is controlled by the ectoderm. *Development* *126*, 4129-4138.

Gage,P.J. and Camper,S.A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 457-464.

Gage,P.J., Suh,H., and Camper,S.A. (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* *126*, 4643-4651.

Galceran,J., Farinas,I., Depew,M.J., Clevers,H., and Grosschedl,R. (1999). Wnt3a^{-/-} like phenotype and limb deficiency in Lef1^(-/-)Tcf1^(-/-) mice. *Genes Dev.* *13*, 709-717.

Ganan,Y., Macias,D., DuterqueCoquillaud,M., Ros,M.A., and Hurler,J.M. (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* *122*, 2349-2357.

Gardner,C.A. and Barald,K.F. (1992). Expression patterns of engrailed-like proteins in the chick embryo. *Dev. Dyn.* *193*, 370-388.

Garrity,D.M., Childs,S., and Fishman,M.C. (2002). The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development* *129*, 4635-4645.

Geduspan,J.S. and MacCabe,J.A. (1987). The ectodermal control of mesodermal patterns of differentiation in the developing chick wing. *Dev. Biol.* *124*, 398-408.

Geduspan,J.S. and MacCabe,J.A. (1989). Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat. Rec.* *224*, 79-87.

Geetha-Loganathan,P., Nimmagadda,S., Huang,R., Scaal,M., and Christ,B. (2006). Expression pattern of BMPs during chick limb development. *Anat. Embryol. (Berl)* *211 Suppl 1*, 87-93.

Gehring,W.J., Affolter,M., and Burglin,T. (1994). Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *63*, 487-526.

Gibson-Brown,J.J., Agulnik,S.I., Chapman,D.L., Alexiou,M., Garvey,N., Silver,L.M., and Papaioannou,V.E. (1996). Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity. *Mech. Dev.* 56, 93-101.

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

Goetinck,P.F. (1964). Studies on limb morphogenesis. I. Experiments with the polydactylous mutant, Talpid. *J. Exp. Zool.* 155, 161-170.

Gomez-Skarmeta,J.L., ez del,C.R., de,l.C.-M., Ferre-Marco,D., and Modolell,J. (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. *Cell* 85, 95-105.

Gomez-Skarmeta,J.L., Glavic,A., de,l.C.-M., Modolell,J., and Mayor,R. (1998). Xiro, a Xenopus homolog of the Drosophila Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *EMBO J.* 17, 181-190.

Goodrich,L.V., Johnson,R.L., Milenkovic,L., McMahon,J.A., and Scott,M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* 10, 301-312.

Goodyer,C.G., Tremblay,J.J., Paradis,F.W., Marcil,A., Lanctot,C., Gauthier,Y., and Drouin,J. (2003). Pitx1 in vivo promoter activity and mechanisms of positive autoregulation. *Neuroendocrinology* 78, 129-137.

Goriely,A., ez del,C.R., and Storey,K.G. (1999). c-Irx2 expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mech. Dev.* 87, 203-206.

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

Guo,Q., Loomis,C., and Joyner,A.L. (2003). Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge. *Dev. Biol.* 264, 166-178.

Helms,J.A., Kim,C.H., Eichele,G., and Thaller,C. (1996). Retinoic acid signaling is required during early chick limb development. *Development* 122, 1385-1394.

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

Hofmann,C., Drossopoulou,G., McMahon,A., Balling,R., and Tickle,C. (1998). Inhibitory action of BMPs on Pax1 expression and on shoulder girdle formation during limb development. *Dev. Dyn.* 213, 199-206.

Hogan,B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 432-438.

Houweling,A.C., Dildrop,R., Peters,T., Mummenhoff,J., Moorman,A.F., Ruther,U., and Christoffels,V.M. (2001). Gene and cluster-specific expression of the Iroquois family members during mouse development. *Mech. Dev.* *107*, 169-174.

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

Kawakami,Y., Esteban,C.R., Matsui,T., Rodriguez-Leon,J., Kato,S., and Belmonte,J.C. (2004). Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development* *131*, 4763-4774.

Kehl,B.T., Cho,K.O., and Choi,K.W. (1998). mirror, a Drosophila homeobox gene in the Iroquois complex, is required for sensory organ and alula formation. *Development* *125*, 1217-1227.

Kengaku,M., Capdevila,J., Rodriguez-Esteban,C., de la,P.J., Johnson,R.L., Belmonte,J.C., and Tabin,C.J. (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* *280*, 1274-1277.

Kengaku,M., Twombly,V., and Tabin,C. (1997). Expression of Wnt and Frizzled genes during chick limb bud development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *62*, 421-429.

Kimmel,R.A., Turnbull,D.H., Blanquet,V., Wurst,W., Loomis,C.A., and Joyner,A.L. (2000). Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.* *14*, 1377-1389.

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

Koshiba-Takeuchi,K., Takeuchi,J.K., Arruda,E.P., Kathiriya,I.S., Mo,R., Hui,C.C., Srivastava,D., and Bruneau,B.G. (2006). Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart. *Nat. Genet.* *38*, 175-183.

Kraus,P., Fraidenaich,D., and Loomis,C.A. (2001). Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.* *100*, 45-58.

L'Honoré,A., Coulon,V., Marcil,A., Lebel,M., Lafrance-Vanasse,J., Gage,P., Camper,S., and Drouin,J. (2007). Sequential expression and redundancy of Pitx2 and Pitx3 genes during muscle development. *Dev. Biol.* *307*, 421-433.

Lamolet,B., Pulichino,A.M., Lamonerie,T., Gauthier,Y., Brue,T., Enjalbert,A., and Drouin,J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* *104*, 849-859.

Lamonerie,T., Tremblay,J.J., Lanctot,C., Therrien,M., Gauthier,Y., and Drouin,J. (1996). Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. *Genes Dev.* *10*, 1284-1295.

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

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

Laufer,E., Nelson,C.E., Johnson,R.L., Morgan,B.A., and Tabin,C. (1994). Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* *79*, 993-1003.

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

Lee,J. and Tickle,C. (1985). Retinoic acid and pattern formation in the developing chick wing: SEM and quantitative studies of early effects on the apical ectodermal ridge and bud outgrowth. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *90*, 139-169.

Lee,J.J., Ekker,S.C., von Kessler,D.P., Porter,J.A., Sun,B.I., and Beachy,P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* *266*, 1528-1537.

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

Lewis,M.T., Ross,S., Strickland,P.A., Snyder,C.J., and Daniel,C.W. (1999). Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tissue Res.* *296*, 549-554.

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

Leyns,L., Gomez-Skarmeta,J.L., and Mbly-Chaudiere,C. (1996). iroquois: a prepatterning gene that controls the formation of bristles on the thorax of *Drosophila*. *Mech. Dev.* *59*, 63-72.

- Li,Q.Y., Newbury-Ecob,R.A., Terrett,J.A., Wilson,D.I., Curtis,A.R., Yi,C.H., Gebuhr,T., Bullen,P.J., Robson,S.C., Strachan,T., Bonnet,D., Lyonnet,S., Young,I.D., Raeburn,J.A., Buckler,A.J., Law,D.J., and Brook,J.D. (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat. Genet.* *15*, 21-29.
- Li,S. and Muneoka,K. (1999). Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Dev. Biol.* *211*, 335-347.
- Lin,C.R., Kioussi,C., O'Connell,S., Briata,P., Szeto,D., Liu,F., Izpisua-Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* *401*, 279-282.
- Linask,K.K., Yu,X., Chen,Y., and Han,M.D. (2002). Directionality of heart looping: effects of Pitx2c misexpression on flectin asymmetry and midline structures. *Dev. Biol.* *246*, 407-417.
- Liu,C., Liu,W., Lu,M.F., Brown,N.A., and Martin,J.F. (2001). Regulation of left-right asymmetry by thresholds of Pitx2c activity. *Development* *128*, 2039-2048.
- Liu,W., Selever,J., Lu,M.-F., and Martin,J.F. (2003). Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* *130*, 6375-6385.
- Logan,M., Martin,J.F., Nagy,A., Lobe,C., Olson,E.N., and Tabin,C.J. (2002). Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis.* *33*, 77-80.
- 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.
- Logan,M. and Tabin,C.J. (1999). Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* *283*, 1736-1739.
- Loomis,C.A., Harris,E., Michaud,J., Wurst,W., Hanks,M., and Joyner,A.L. (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* *382*, 360-363.
- Loomis,C.A., Kimmel,R.A., Tong,C.X., Michaud,J., and Joyner,A.L. (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* *125*, 1137-1148.
- Lu,M.F., Pressman,C., Dyer,R., Johnson,R.L., and Martin,J.F. (1999). Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* *401*, 276-278.

- MacCabe,J.A., MacCabe,A.B., Abbott,U.K., and McCarrey,J.R. (1975). Limb development in diplopodia4: a polydactylous mutation in the chicken. *J. Exp. Zool.* *191*, 383-394.
- Marcil,A., Dumontier,E., Chamberland,M., Camper,S.A., and Drouin,J. (2003). Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* *130*, 45-55.
- Mariani,F.V., Ahn,C.P., and Martin,G.R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* *453*, 401-405.
- Maxwell,S.L., Ho,H.Y., Kuehner,E., Zhao,S., and Li,M. (2005). Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev. Biol.* *282*, 467-479.
- McFadden,D.G., McAnally,J., Richardson,J.A., Charite,J., and Olson,E.N. (2002). Misexpression of dHAND induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding. *Development* *129*, 3077-3088.
- McGlinn,E., van Bueren,K.L., Fiorenza,S., Mo,R., Poh,A.M., Forrest,A., Soares,M.B., Bonaldo,M.F., Grimmond,S., Hui,C.C., Wainwright,B., and Wicking,C. (2005). Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mech. Dev.* *122*, 1218-1233.
- McNeill,H., Yang,C.H., Brodsky,M., Ungos,J., and Simon,M.A. (1997). mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the Drosophila eye. *Genes Dev.* *11*, 1073-1082.
- Mendelsohn,C., Ruberte,E., and Chambon,P. (1992). Retinoid receptors in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* *152*, 50-61.
- Mendelsohn,C., Ruberte,E., LeMeur,M., Morriss-Kay,G., and Chambon,P. (1991). Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR-beta 2 promoter in transgenic animals. *Development* *113*, 723-734.
- Menke,D.B., Guenther,C., and Kingsley,D.M. (2008). Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs. *Development* *135*, 2543-2553.
- Meno,C., Shimono,A., Saijoh,Y., Yashiro,K., Mochida,K., Ohishi,S., Noji,S., Kondoh,H., and Hamada,H. (1998). lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal. *Cell* *94*, 287-297.
- Mercader,N., Leonardo,E., Piedra,M.E., Martinez,A., Ros,M.A., and Torres,M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* *127*, 3961-3970.

Meyers,E.N., Lewandoski,M., and Martin,G.R. (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat. Genet.* *18*, 136-141.

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

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

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

Mitsiadis,T.A. and Drouin,J. (2008). Deletion of the Pitx1 genomic locus affects mandibular tooth morphogenesis and expression of the Barx1 and Tbx1 genes. *Dev. Biol.* *313*, 887-896.

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

Muccielli,M.L., Martinez,S., Pattyn,A., Goridis,C., and Brunet,J.F. (1996). Otlx2, an Otx-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol. Cell Neurosci.* *8*, 258-271.

Mummenhoff,J., Houweling,A.C., Peters,T., Christoffels,V.M., and Ruther,U. (2001). Expression of Irx6 during mouse morphogenesis. *Mech. Dev.* *103*, 193-195.

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

Naiche,L.A. and Papaioannou,V.E. (2007). Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth. *Development* *134*, 93-103.

Netter,S., Fauvarque,M.O., ez del,C.R., Dura,J.M., and Coen,D. (1998). white+ transgene insertions presenting a dorsal/ventral pattern define a single cluster of homeobox genes that is silenced by the polycomb-group proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *149*, 257-275.

Neubuser,A., Koseki,H., and Balling,R. (1995). Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev. Biol.* *170*, 701-716.

Neubuser,A., Peters,H., Balling,R., and Martin,G.R. (1997). Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 90, 247-255.

Ng,J.K., Kawakami,Y., Buscher,D., Raya,A., Itoh,T., Koth,C.M., Rodriguez,E.C., Rodriguez-Leon,J., Garrity,D.M., Fishman,M.C., and Izpisua Belmonte,J.C. (2002). The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development* 129, 5161-5170.

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

Niederreither,K., Vermot,J., Schuhbaur,B., Chambon,P., and Dolle,P. (2002). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development* 129, 3563-3574.

Niederreither,K., Ward,S.J., Dolle,P., and Chambon,P. (1996). Morphological and molecular characterization of retinoic acid-induced limb duplications in mice. *Dev. Biol.* 176, 185-198.

Nissim,S., Hasso,S.M., Fallon,J.F., and Tabin,C.J. (2006). Regulation of Gremlin expression in the posterior limb bud. *Dev. Biol.* 299, 12-21.

Niswander,L. (1999). Developmental biology. Legs to wings and back again. *Nature* 398, 751-752.

Niswander,L. and Martin,G.R. (1993). FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* 361, 68-71.

Niswander,L., Tickle,C., Vogel,A., Booth,I., and Martin,G.R. (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75, 579-587.

Nunes,I., Tovmasian,L.T., Silva,R.M., Burke,R.E., and Goff,S.P. (2003). *Pitx3* is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 4245-4250.

Ohuchi,H., Nakagawa,T., Yamauchi,M., Ohata,T., Yoshioka,H., Kuwana,T., Mima,T., Mikawa,T., Nohno,T., and Noji,S. (1995). An additional limb can be induced from the flank of the chick embryo by FGF4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 809-816.

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

- Ornitz,D.M., Xu,J., Colvin,J.S., McEwen,D.G., MacArthur,C.A., Coulier,F., Gao,G., and Goldfarb,M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol. Chem.* *271*, 15292-15297.
- Orr-Urtreger,A., Givol,D., Yayon,A., Yarden,Y., and Lonai,P. (1991). Developmental expression of two murine fibroblast growth factor receptors, flg and bek. *Development* *113*, 1419-1434.
- Ortega,S., Ittmann,M., Tsang,S.H., Ehrlich,M., and Basilico,C. (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 5672-5677.
- Pajni-Underwood,S., Wilson,C.P., Elder,C., Mishina,Y., and Lewandoski,M. (2007). BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* *134*, 2359-2368.
- Park,H.L., Bai,C., Platt,K.A., Matise,M.P., Beeghly,A., Hui,C.C., Nakashima,M., and Joyner,A.L. (2000). Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* *127*, 1593-1605.
- Parr,B.A. and McMahon,A.P. (1995). Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* *374*, 350-353.
- Parr,B.A., Shea,M.J., Vassileva,G., and McMahon,A.P. (1993). Mouse *Wnt* genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* *119*, 247-261.
- Peters,H., Neubuser,A., Kratochwil,K., and Balling,R. (1998). *Pax9*-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* *12*, 2735-2747.
- Peters,H., Wilm,B., Sakai,N., Imai,K., Maas,R., and Balling,R. (1999). *Pax1* and *Pax9* synergistically regulate vertebral column development. *Development* *126*, 5399-5408.
- Peters,T., Dildrop,R., Ausmeier,K., and Ruther,U. (2000). Organization of mouse Iroquois homeobox genes in two clusters suggests a conserved regulation and function in vertebrate development. *Genome Res.* *10*, 1453-1462.
- Piedra,M.E., Icardo,J.M., Albajar,M., Rodriguez-Rey,J.C., and Ros,M.A. (1998). *Pitx2* participates in the late phase of the pathway controlling left-right asymmetry. *Cell* *94*, 319-324.
- Pinson,K.I., Brennan,J., Monkley,S., Avery,B.J., and Skarnes,W.C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates *Wnt* signalling in mice. *Nature* *407*, 535-538.

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

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

Porter,J.A., von Kessler,D.P., Ekker,S.C., Young,K.E., Lee,J.J., Moses,K., and Beachy,P.A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363-366.

Porter,J.A., Young,K.E., and Beachy,P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259.

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

Poulin,G., Turgeon,B., and Drouin,J. (1997). NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Mol. Cell Biol.* 17, 6673-6682.

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

Riddle,R.D., Ensini,M., Nelson,C., Tsuchida,T., Jessell,T.M., and Tabin,C. (1995). Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83, 631-640.

Riddle,R.D., Johnson,R.L., Laufer,E., and Tabin,C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.

Rieger,D.K., Reichenberger,E., McLean,W., Sidow,A., and Olsen,B.R. (2001). A double-deletion mutation in the *Pitx3* gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics* 72, 61-72.

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

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 Dev.* 5, 1333-1344.

Rubin,L. and Saunders J.W.Jr. (1972). Ectodermal-mesodermal interactions in the growth of limb buds in the chick embryo: constancy and temporal limits of the ectodermal induction. *Dev. Biol.* 28, 94-112.

Rutledge, J.C., Shourbaji, A.G., Hughes, L.A., Polifka, J.E., Cruz, Y.P., Bishop, J.B., and Generoso, W.M. (1994). Limb and lower-body duplications induced by retinoic acid in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 5436-5440.

Ruvinsky, I. and Silver, L.M. (1997). Newly identified paralogous groups on mouse chromosomes 5 and 11 reveal the age of a T-box cluster duplication. *Genomics* *40*, 262-266.

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

Sakiyama, J., Yamagishi, A., and Kuroiwa, A. (2003). Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development* *130*, 1225-1234.

Saunders J.W.Jr. and Gasseling M.T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, Fleischmjer R and Billingham RE, eds. (Baltimore: pp. 78-97.

Saunders, J.W.J. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.* *108*, 363-403.

Saxton, T.M., Ciruna, B.G., Holmyard, D., Kulkarni, S., Harpal, K., Rossant, J., and Pawson, T. (2000). The SH2 tyrosine phosphatase shp2 is required for mammalian limb development. *Nat. Genet.* *24*, 420-423.

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

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

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

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

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

Sheng,H.Z., Zhadanov,A.B., Mosinger,B., Jr., Fujii,T., Bertuzzi,S., Grinberg,A., Lee,E.J., Huang,S.P., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 272, 1004-1007.

Shih,H.P., Gross,M.K., and Kioussi,C. (2007). Cranial muscle defects of Pitx2 mutants result from specification defects in the first branchial arch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 5907-5912.

Shiratori,H., Sakuma,R., Watanabe,M., Hashiguchi,H., Mochida,K., Sakai,Y., Nishino,J., Saijoh,Y., Whitman,M., and Hamada,H. (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol. Cell* 7, 137-149.

Smidt,M.P., Smits,S.M., Bouwmeester,H., Hamers,F.P., van der Linden,A.J., Hellemons,A.J., Graw,J., and Burbach,J.P. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145-1155.

Smidt,M.P., van Schaick,H.S., Lanctot,C., Tremblay,J.J., Cox,J.J., van der Kleij,A.A., Wolterink,G., Drouin,J., and Burbach,J.P. (1997). A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13305-13310.

Soshnikova,N., Zechner,D., Huelsken,J., Mishina,Y., Behringer,R.R., Taketo,M.M., Crenshaw,E.B., III, and Birchmeier,W. (2003). Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev.* 17, 1963-1968.

Stratford,T., Horton,C., and Maden,M. (1996). Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Curr. Biol.* 6, 1124-1133.

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

Summerbell,D. (1974). A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb-bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 32, 651-660.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tan,J.T., Korzh,V., and Gong,Z. (1999). Expression of a zebrafish iroquois homeobox gene, *Ziro3*, in the midline axial structures and central nervous system. *Mech. Dev.* *87*, 165-168.

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

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

Tickle,C., Alberts,B., Wolpert,L., and Lee,J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* *296*, 564-566.

Timmons,P.M., Wallin,J., Rigby,P.W., and Balling,R. (1994). Expression and function of *Pax 1* during development of the pectoral girdle. *Development* *120*, 2773-2785.

Todt,W.L. and Fallon,J.F. (1984). Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *80*, 21-41.

Treisman,J., Gonczy,P., Vashishtha,M., Harris,E., and Desplan,C. (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59, 553-562.

Treisman,J., Harris,E., and Desplan,C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev.* 5, 594-604.

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

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

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

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

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

Vargesson,N., Clarke,J.D., Vincent,K., Coles,C., Wolpert,L., and Tickle,C. (1997). Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development* 124, 1909-1918.

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

Vogel,A., Rodriguez,C., Warnken,W., and Izpisua Belmonte,J.C. (1995). Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. *Nature* 378, 716-720.

Wallin,J., Wilting,J., Koseki,H., Fritsch,R., Christ,B., and Balling,R. (1994). The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 120, 1109-1121.

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

- Wolpert,L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1-47.
- Xu,J., Liu,Z., and Ornitz,D.M. (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* 127, 1833-1843.
- Yang,Y., Drossopoulou,G., Chuang,P.T., Duprez,D., Marti,E., Bumcrot,D., Vargesson,N., Clarke,J., Niswander,L., McMahon,A., and Tickle,C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124, 4393-4404.
- Yu,X., St Amand,T.R., Wang,S., Li,G., Zhang,Y., Hu,Y.P., Nguyen,L., Qiu,M.S., and Chen,Y.P. (2001). Differential expression and functional analysis of Pitx2 isoforms in regulation of heart looping in the chick. *Development* 128, 1005-1013.
- Zakany,J., Zacchetti,G., and Duboule,D. (2007). Interactions between HOXD and Gli3 genes control the limb apical ectodermal ridge via Fgf10. *Dev. Biol.* 306, 883-893.
- Zeng,X., Goetz,J.A., Suber,L.M., Scott,W.J., Jr., Schreiner,C.M., and Robbins,D.J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-720.
- Zhang,X., Ibrahimi,O.A., Olsen,S.K., Umemori,H., Mohammadi,M., and Ornitz,D.M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* 281, 15694-15700.
- Zhou,M., Sutliff,R.L., Paul,R.J., Lorenz,J.N., Hoying,J.B., Haudenschild,C.C., Yin,M., Coffin,J.D., Kong,L., Kraniias,E.G., Luo,W., Boivin,G.P., Duffy,J.J., Pawlowski,S.A., and Doetschman,T. (1998). Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat. Med.* 4, 201-207.
- Zhu,X., Komiya,H., Chirino,A., Faham,S., Fox,G.M., Arakawa,T., Hsu,B.T., and Rees,D.C. (1991). Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251, 90-93.
- Zuniga,A., Haramis,A.P., McMahon,A.P., and Zeller,R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401, 598-602.
- Zuniga,A. and Zeller,R. (1999). Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarizing region and control of posterior limb-bud identity. *Development* 126, 13-21.