



Université de Montréal

Régulation de l'identité des membres postérieurs par le facteur de  
transcription à boîte T Tbx4

Par

Jean-François Ouimette

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)

En biologie moléculaire

Août 2010

© Jean-François Ouimette, 2010

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

**Régulation de l'identité des membres postérieurs par le facteur de  
transcription à boîte T Tbx4**

présentée par

Jean-François Ouimette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Marie Kmita, Président-rapporteur

Dr Jacques Drouin, Directeur de recherche

Dr Stéphane Roy, Membre du jury

Dr Maxime Bouchard, Examineur externe

Dre Muriel Aubry, Représentant du doyen

## Résumé

Bien que partageant une homologie structurelle évidente, les membres antérieurs (MA) sont toujours différents des membres postérieurs (MP). Ceci suggère l'existence d'un programme générique de formation d'un membre, un bauplan, qui doit être modulé de façon spécifique pour engendrer cette différence antéro-postérieure de l'identité. Nous avons donc voulu identifier les mécanismes déployés durant l'évolution pour permettre la mise en place de l'identité des membres. Le laboratoire avait précédemment caractérisé, chez les souris où le gène *Pitx1* est inactivé, une transformation partielle des MP en MA couplée à une perte de croissance. Nous avons donc cherché à comprendre les mécanismes en aval de *Pitx1* dans la détermination de l'identité postérieure. Notre démarche nous a permis d'identifier les gènes affectés par la perte de *Pitx1* dans les MP, où nous avons confirmé une dérégulation de l'expression de *Tbx4*. *Tbx4* et *Tbx5* sont des candidats évidents pour déterminer l'identité, leur expression étant restreinte aux MP et MA, respectivement, mais leur implication dans ce processus était sujette à controverse.

Nous avons donc évalué l'apport de *Tbx4* en aval de *Pitx1* dans les processus d'identité en restaurant son expression dans les MP des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>. Ce faisant, nous avons pu montrer que *Tbx4* est capable de pallier la perte de *Pitx1* dans le MP, en rétablissant à la fois les caractères d'identité postérieure et la croissance. En parallèle, nous avons montré que *Tbx5* était capable de rétablir la croissance mais non l'identité des MP *Pitx1*<sup>-/-</sup>, démontrant

ainsi de façon définitive une propriété propre à Tbx4 dans la détermination de l'identité des membres postérieure.

La caractérisation de l'activité transcriptionnelle de Tbx4 et Tbx5 nous a permis de mettre en évidence un domaine activateur conservé mais aussi un domaine spécifique à Tbx4, répresseur de la transcription. Par ailleurs, une mutation faux-sens de TBX4 dans les patients atteints du syndrome coxo-podo-patellaire, TBX4Q531R, inactive le domaine répresseur, empêchant la compensation de l'identité mais non de la croissance des MP dépourvus de Pitx1, démontrant l'importance de cette fonction dans l'identité postérieure. La caractérisation de l'activité répressive de Tbx4, qui se manifeste seulement dans les membres postérieurs démontre l'importance de cette fonction dans l'identité postérieure. Nous avons aussi été en mesure d'identifier un corépresseur qui est suffisant pour supporter cette activité de Tbx4. Enfin, nous avons pu aussi démontrer l'activité transcriptionnelle d'un représentant du gène ancestral, présent chez *Amphioxus*, qui se comporte strictement comme un activateur et semble dépourvu du domaine répresseur. En somme, nous avons précisé le rôle de Tbx4 et Tbx5, ainsi que leur mécanisme, dans la détermination de l'identité des membres. Globalement, nos travaux permettent d'élaborer une théorie où une divergence d'activité transcriptionnelle de Tbx4 et Tbx5 est responsable de l'identité des membres et même entrevoir que cette divergence d'activité soit à la base de son apparition durant l'évolution.

**Mots clés :** Tbx4, Tbx5, Pitx1, transcription, développement des membres, identité, morphogénèse, patrons squelettiques, transgénèse

## Summary

Forelimbs and hindlimbs are a classical example of serial homology, suggesting they share an evolutionary common generic program that directs their formation. Identity is presumably derived from specific modulations of that program in different limb type. Transcription factors are prime candidates to link these structural differences to specific modulations and three factors with limb-specific expression have been identified. *Pitx1* and *Tbx4* expression is restricted to the hindlimbs while *Tbx5* is restricted to the forelimbs and they have all been ascribed functions in both growth and identity from knockout and overexpression studies. Recent studies have produced evidence that *Tbx4* and *Tbx5* are interchangeable, sharing identical properties to support growth but not identity of the limbs, the latter being a direct consequence of *Pitx1* expression. Indeed, *Pitx1* deficient mice have been previously described as undergoing a hindlimb-to-forelimb transformation in addition of growth defects.

To better assess the shared and specific properties of *Tbx4* and *Tbx5*, we assessed their capacities to rescue identity and growth defects by expression studies in *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimbs. Specifically, previous studies had shown that *Pitx1* deficiency causes the loss of hindlimb features, the transformation of hindlimb features toward forelimb-like morphology, the gain of a forelimb feature and the asymmetric loss of growth at the level of the femur. Targeted expression in the limbs of both *Tbx4* and *Tbx5* rescued the growth defects similarly. Interestingly, only *Tbx4* was able to restore identity features affected in absence of *Pitx1*.

To further assess these shared and specific properties, we conducted transcriptional assays that revealed the presence of a shared and conserved transactivating domain in the C-terminal moiety of these proteins. Moreover, we could identify a repressor domain specific to Tbx4. Human small patella syndrome maps to *TBX4* and a coding mutation, TBX4Q531R, that specifically inactivates the repressive properties of Tbx4 prevents it from rescuing identity to the *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimbs but not from rescuing growth. We also conducted a yeast two-hybrid assay that allowed the identification of putative co-factors of Tbx4, of which one seems to act as a co-repressor.

Together, our results support the presence of a Tbx4/Tbx5 conserved activating domain required for limb outgrowth that is an integral part of the limb *bauplan*. Importantly, we identified a molecular basis for the determination of limb identity through the Tbx4-specific repressor domain and reveal a novel path through which limb identity may have emerged during evolution.

**Key words:** Tbx4, Tbx5, Pitx1, transcription, limb development, identity, morphogenesis, skeletal pattern, transgenesis

## Table des matières

<b>Titre .....</b>	<b>i</b>
<b>Identification du jury.....</b>	<b>ii</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary.....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vii</b>
<b>Listes des figures.....</b>	<b>xi</b>
<b>Listes des abréviations .....</b>	<b>xvi</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xviii</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 L'étude du développement des membres – le préambule.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Mécanismes généraux de développement des membres .....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Apparition et évolution des membres .....	26
1.2.2 Formation du membre .....	32
1.2.3 La croissance du membre : le rôle de la crête apicale ectodermique .....	34
1.2.3.1 La crête apicale ectodermique: formation, maintenance et régression .....	37
1.2.3.2 Les signaux de la crête apicale ectodermique.....	41
1.2.3.3 Vers un modèle de spécification par des signaux.....	42
1.2.4 La spécification selon l'axe antéro-postérieur .....	45
1.2.4.1 La zone d'activité polarisante.....	46
1.2.5 La spécification selon l'axe dorso-ventral.....	50
1.2.6 Intégration tridimensionnelle des signaux par le mésenchyme .....	53
<b>1.3 Mise en place de l'identité des membres .....</b>	<b>59</b>
1.3.1 Différences morphologiques.....	59
1.3.2 Identification de facteurs impliqués dans la spécification et la détermination de l'identité des membres. ....	64
1.3.2.1 <i>Pitx1</i> est en amont des processus d'identité et de croissance des membres postérieurs .....	67
1.3.2.2 <i>Tbx4</i> et le développement des membres postérieurs .....	72
1.3.2.3 Le rôle de <i>Tbx5</i> dans les membres antérieurs.....	76
1.3.2.4 Intégration du rôle de <i>Pitx1</i> , <i>Tbx4</i> et <i>Tbx5</i> dans le développement des membres .....	79
<b>1.4 Les gènes à boîtes T .....</b>	<b>82</b>
1.4.1 Mécanismes de régulation de l'expression génique par les facteurs à boîtes T .....	86
1.4.2 Activité transcriptionnelle de la sous-famille <i>Tbx2</i> .....	90
<b>Chapitre 2 : Divergent transcriptional activities determine limb identity ...</b>	<b>95</b>
<b>2.1 Contribution :.....</b>	<b>96</b>
<b>2.2 Abstract.....</b>	<b>97</b>
<b>2.3 Introduction .....</b>	<b>98</b>
<b>2.4 Results .....</b>	<b>101</b>
Tbx4 not Tbx5 rescues Pitx1-dependent HL morphology. ....	101
Tbx4 but not Tbx5 rescues HL muscle patterning.....	103



Growth properties shared by Tbx4 and Tbx5 .....	104
Molecular mechanism underlying HL-specific activity of Tbx4 .....	105
Tbx4 repressor activity correlates with HL patterning. ....	107
Ancestral Tbx4/5 is devoid of repressor activity. ....	108
<b>2.5 Discussion .....</b>	<b>109</b>
<b>2.6 Methods.....</b>	<b>111</b>
Mouse lines, embryos and skeletal preparations .....	111
Bone length and angle measurements.....	112
Statistical analyses.....	112
Wholemount <i>In Situ</i> Hybridization and Immunocytochemistry .....	112
Branchiostoma floridae (amphioxus) Tbx4/5 cDNA cloning .....	113
Transfections.....	113
Expression Analysis .....	114
Western Blot.....	115
<b>2.7 References .....</b>	<b>117</b>
<b>2.8 Footnotes .....</b>	<b>123</b>
<b>2.9 Figure Legends.....</b>	<b>125</b>
<b>Chapitre 3 : Prmt7 acts as a transcriptional co-repressor of Tbx4 .....</b>	<b>140</b>
<b>3.1 Contribution :</b> .....	<b>141</b>
<b>3.2 Abstract :</b> .....	<b>142</b>
<b>3.3 Introduction .....</b>	<b>143</b>
<b>3.4 Results .....</b>	<b>146</b>
Divergent transcriptional activities of Tbx4 and Tbx5.....	146
Cell-specific repressive activity of Tbx4 .....	147
Identification of Tbx4 partners by yeast two-hybrid .....	148
Prmt7 is sufficient to reconstitute Tbx4 repressor activity .....	149
<b>3.5 Discussion .....</b>	<b>152</b>
<b>3.6 References .....</b>	<b>155</b>
<b>3.7 Methods.....</b>	<b>161</b>
Cell culture and transfection .....	161
Gel retardation assays .....	162
Yeast two-hybrid screen.....	162
RNA quantification.....	163
Preparation and characterization of affinity-purified anti-Tbx4 antibody .....	164
Histology, immunohistochemistry and immunofluorescence.....	164
<b>3.8 Footnotes .....</b>	<b>165</b>
<b>3.9 Figure Legends.....</b>	<b>166</b>
<b>Chapitre 4: A MUSCLE-SPECIFIC PROMOTER DIRECTS PITX3 GENE</b>	
<b>EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE CELLS .....</b>	<b>181</b>
<b>4.1 ABSTRACT.....</b>	<b>182</b>
<b>4.2 INTRODUCTION.....</b>	<b>183</b>
<b>4.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....</b>	<b>186</b>
Wholemount in situ hybridization.....	186
LacZ staining and immunohistochemistry .....	186
RNA analyses.....	186
Chromatin immunoprecipitation (ChIP) .....	187
Transgene constructs .....	189
Transgenic mice .....	190
Cell culture and transfection .....	190
Software .....	191

<b>4.4 RESULTS</b> .....	<b>192</b>
Pitx3 is expressed in developing muscles of aphakia mice.....	192
A muscle-specific Pitx3 exon 1.....	193
A muscle cell-specific Pitx3 gene promoter.....	195
The Pitx3 muscle-specific promoter is active in myoblasts and in differentiating muscle cells.....	197
Myogenic bHLH regulatory factors activate the Pitx3 muscle promoter.....	198
Chromatin signature of muscle-specific promoter.....	199
<b>4.5 DISCUSSION</b> .....	<b>201</b>
A muscle-specific promoter and exon of the Pitx3 locus.....	201
Role of Pitx transcription factors in the program of muscle gene expression.....	202
<b>4.6 REFERENCES</b> .....	<b>204</b>
<b>4.7 FOOTNOTES</b> .....	<b>209</b>
<b>4.8 FIGURE LEGENDS</b> .....	<b>210</b>
<b>Chapitre 5 : Résultats supplémentaires</b> .....	<b>222</b>
<b>5.1 Régulation transcriptionnelle de <i>Tbx4</i> par Pitx1</b> .....	<b>222</b>
<b>5.2 Sites de fixation de Pitx1, Tbx4 et Tbx5 dans le promoteur de <i>Fgf10</i> et <i>Tbx2</i></b> .....	<b>225</b>
<b>Chapitre 6 : Discussion</b> .....	<b>231</b>
<b>6.1 Établissement de l'identité des membres</b> .....	<b>231</b>
<b>6.2 Le programme générique de développement des membres et sa régulation par Pitx1, Tbx4 et Tbx5</b> .....	<b>235</b>
<b>6.3 Spécificité transcriptionnelle de Tbx4 et Tbx5</b> .....	<b>244</b>
<b>6.4 Tenants moléculaire de l'identité</b> .....	<b>245</b>
<b>6.4 L'activité positive de Tbx4 et le développement du membre</b> .....	<b>251</b>
<b>6.5 Activité transcriptionnelle ancestrale de Tbx4/5</b> .....	<b>254</b>
<b>6.6 Programme en aval de Pitx1</b> .....	<b>255</b>
<b>6.7 Approche biaisée du rôle de <i>Pitx1</i> indépendant de <i>Tbx4</i> dans la mise en place de l'identité</b> .....	<b>258</b>
<b>6.8 Perspectives</b> .....	<b>262</b>
<b>Chapitre 7: Liste de références</b> .....	<b>265</b>
<b>Annexe 1: Bone Morphogenic Protein (Smad)-Mediated Repression of Proopiomelanocortin Transcription by Interference with Pitx/Tpit Activity</b> .....	<b>xxii</b>
<b>A1.1 Abstract</b> :.....	<b>xxiii</b>
<b>A1.2 Introduction</b> .....	<b>xxiv</b>
<b>A1.3 Methods</b> .....	<b>xxix</b>
<b>Materials</b> .....	<b>xxix</b>
Plasmids and Oligonucleotides.....	xxix
Cell Culture and Transfection Assays.....	xxx
RNA Isolation and Northern Blot Analysis.....	xxxi
RT-PCR.....	xxxii
Nuclear Extracts and Western Blot Analysis.....	xxxii
GST Protein Purification and Pull-Down Assay.....	xxxiii
Chromatin Immunoprecipitation.....	xxxiv
<b>A1.4 Results</b> .....	<b>xxxvi</b>
BMP4 Inhibits POMC Expression in AtT-20 Cells.....	xxxvi

BMP4 Repression Is Mediated through BMP-Specific Receptors and Smad1/4 Transcription Factors .....	xxxvii
BMP/Smad1 Signaling Specifically Represses POMC Promoter Activity .....	xxxix
Smad6 and Smad7 Counteract BMP-Mediated Repression of POMC .....	xli
Negative BMP/Smad Signals Target Pitx/Tpit Activities on the POMC Promoter ..	xli
Smad1, Pitx1, and Tpit Proteins Interact <i>in Vitro</i> .....	xlili
<b>A1.5 Discussion</b> .....	<b>xliv</b>
Mechanisms of BMP Repression of POMC Transcription .....	xliv
Specificity of BMP Repression of POMC .....	xlvii
Possible Role of BMPs in Pituitary .....	l
<b>A1.6. References</b> .....	<b>lii</b>
<b>A1.7 Acknowledgements</b> .....	<b>lxv</b>
<b>A1.8 Footnotes</b> .....	<b>lxvi</b>
<b>A1.9 Figure Legends</b> .....	<b>lxvii</b>
<b>Annexe2 : PITX2 DEFINES ALTERNATE PATHWAYS ACTING THROUGH MyoD DURING LIMB AND SOMITIC MYOGENESIS</b> .....	<b>lxxxii</b>
<b>A1.1 ABSTRACT</b> .....	<b>lxxxiii</b>
<b>A2.2 INTRODUCTION</b> .....	<b>lxxxiv</b>
<b>A2.3 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>lxxxviii</b>
Animal handling and genotyping .....	lxxxviii
Wholemount in situ hybridization and X-Gal staining, histology and immunohistochemistry .....	lxxxviii
Plasmids and transfection assays .....	xc
Chromatin immunoprecipitation .....	xc
<b>A2.4 RESULTS</b> .....	<b>xcii</b>
<i>MyoD</i> expression is decreased in <i>Pitx2</i> <sup>-/-</sup> limb buds .....	xcii
Delayed myogenic differentiation in <i>Pitx2</i> <sup>-/-</sup> limb buds .....	xciii
<i>Pitx2</i> acts directly on the <i>MyoD</i> core enhancer .....	xciv
<i>Myf5</i> cooperates with <i>Pitx2</i> for limb <i>MyoD</i> expression .....	xcvii
<i>Pitx2</i> in myotome expression of <i>MyoD</i> .....	xcviii
<b>A2.5 DISCUSSION</b> .....	<b>ci</b>
<b>A2.6 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>cvii</b>
<b>A2.8 FIGURE LEGENDS</b> .....	<b>cxix</b>
<b>A3.9 SUPPLEMENTARY FIGURES</b> .....	<b>cxxv</b>

## Listes des figures

Figure 1.1: Homologie du squelette de la main des mammifères. ....	25
Figure 1.2: Évolution des membres pairs.....	29
Figure 1.3. Modèle de la zone de progression. ....	36
Figure 1.4: Structure des membres antérieurs (m. a.) et postérieurs (m. p.) d'embryons au jour embryonnaire 14.5 représenté grâce à la tomographie par projection optique. ....	61
Figure 1.5 : Phénotype des souris <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> au niveau de la mandibule et des membres postérieurs.....	68
Figure 1.6: Émergence et conservation des facteurs <i>Tbx4</i> et <i>Tbx5</i> .....	85
Figure 2.1. Rescue of <i>Tbx4</i> expression in <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> hindlimb buds.....	131
Figure 2.2. Rescue of <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> hindlimb (HL) skeletal defects by <i>Tbx4</i> , but not <i>Tbx5</i> .....	132
Figure 2.3. <i>Tbx4</i> rescues muscle patterning of <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> hindlimbs.....	133
Figure 2.4. Rescue of <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> HL bone growth by <i>Tbx4</i> and <i>Tbx5</i> expression. ....	134
Figure 2.5. Hindlimb-specific functions of <i>Tbx4</i> correlate with repressor activity that is lost in human small-patella mutation <i>TBX4Q531R</i> . ....	135

Figure 2.6. Transcriptional basis for evolution of Tbx4/5 roles in limb development.....	136
Table 2.1. Summary of <i>Pitx1</i> <sup>-/-</sup> hindlimb defects and rescue by <i>Tbx4</i> , <i>Tbx5</i> and <i>Tbx4Q538R</i> .....	137
Figure S2.1. Sequence conservation in Tbx4 and Tbx5 activator domains and in comparison to <i>Amphioxus</i> Tbx4/5.....	138
Figure 3.1: Tbx4 and Tbx5 display divergent transcriptional activities	169
Figure 3.2 Context-dependent Tbx4 and Tbx5 activity.....	170
Figure 3.3 Expression of Tbx4 putative co-factors identified by yeast two-hybrid screen.....	171
Figure 3.4 Prmt7 is sufficient to reconstitute Tbx4 repressor activity..	172
Supplementary Table 3.1.....	173
Supplementary Table 3.2.....	177
Supplementary Figure 3.1 Characteristics of the Tbx4-expressing yeasts used for the two-hybrid screen.....	178
Figure 4.1. <i>Pitx3</i> is expressed in myotome and developing skeletal muscles of <i>ak</i> mutant mice that carry deletions in the <i>Pitx3</i> locus. ....	214
Figure 4.2. Structure of the <i>Pitx3</i> gene. ....	215
Figure 4.3. The <i>Pitx3</i> muscle-specific promoter. ....	216

<b>Figure 4.4. <i>In vivo</i> activity of the <i>Pitx3</i> muscle-specific promoter.....</b>	<b>217</b>
<b>Figure 4.5. Muscle specificity of transgenic <i>Pitx3</i> promoter activity. ....</b>	<b>218</b>
<b>Figure 4.6. Activation of the <i>Pitx3</i> muscle promoter by MyoD. ....</b>	<b>219</b>
<b>Figure 4.7. Analysis of <i>Pitx3</i> gene locus by CHIP in e13 limb buds. ....</b>	<b>220</b>
<b>Figure 5.1 Régulation de l'expression de <i>Tbx4</i> par Pitx1.....</b>	<b>223</b>
<b>Figure 5.2 Liaison au promoteur de Fgf10.....</b>	<b>227</b>
<b>Figure 6.1: Rôles proposés de Pitx1 dans le contrôle de l'identité postérieure.....</b>	<b>234</b>
<b>Figure 6.2: Rôles potentiels de <i>Pitx1</i> dans le contrôle de la croissance des membres postérieurs.....</b>	<b>237</b>
<b>Figure 6.3: Contrôle d'un programme générique de formation des membres par Tbx4 et Tbx5.....</b>	<b>239</b>
<b>Figure 6.4: Modèle proposé de détermination de l'identité à l'échelle cellulaire.....</b>	<b>249</b>
<b>Fig. A1.1. BMP4 Represses POMC Expression and Promoter Activity.....</b>	<b>lxvii</b>
<b>Fig. A1.2. BMP4 Repression Is Mediated through BMP-Specific Receptors and Smad1/4 Transcription Factors .....</b>	<b>lxviii</b>
<b>Fig. A1.3. BMP/Smad1 Signaling Specifically Represses POMC .....</b>	<b>lxix</b>

<b>Fig. A1.4. Inhibitory Smad6 and Smad7 Reverse BMP/Smad-Dependent POMC Repression.....</b>	<b>lxxv</b>
<b>Fig. A1.5. BMP Signals Target Pitx1 and Tpit Regulatory Elements on POMC .....</b>	<b>lxxvi</b>
<b>Fig. A1.6. The Tpit/Pitx Regulatory Element Is Sufficient for BMP Repression without Changes in Tpit or Pitx Levels .....</b>	<b>lxxvii</b>
<b>Fig. A1.7. Smad1 Interacts with Pitx1 and Tpit and Is Recruited to the POMC Promoter .....</b>	<b>lxxviii</b>
<b>Fig. A1.8. Model for BMP-Induced Transcriptional Repression of POMC .....</b>	<b>lxxix</b>
<b>Figure A2.1. Limb expression of Pitx2 precedes Myf5 and MyoD....</b>	<b>cxxviii</b>
<b>Figure A2.2. <i>MyoD</i> and <i>myogenin</i>, but not <i>Myf5</i>, expression are deficient in limbs of <i>Pitx2</i> mutant embryos.....</b>	<b>cxxix</b>
<b>Figure A2.3. Limb MyoD deficiency is transient in <i>Pitx2</i><sup>-/-</sup> embryos. ...</b>	<b>cxxx</b>
<b>Figure A2.4. Pitx2 directly regulates <i>MyoD</i> expression through binding of the core enhancer (CE).....</b>	<b>cxxxii</b>
<b>Figure A2.5. <i>Myf5</i> compensates functionally for <i>MyoD</i> expression in <i>Pitx2</i><sup>-/-</sup> limbs.....</b>	<b>cxxxiii</b>
<b>Figure A2.6. <i>Pitx2</i> is sufficient for hypaxial myotome expression of <i>MyoD</i> in absence of <i>Myf5</i>(<i>Mrf4</i>).....</b>	<b>cxxxiii</b>

Figure A2.7. Cooperation between <i>Pax3/Pitx2</i> and <i>Myf5/Mrf4</i> pathways for <i>MyoD</i> expression in myotome and shoulder girdle muscle. ....	cxxxiv
Figure A2.8. <i>MyoD</i> gene regulation. ....	cxxxv
Figure A2.S1. <i>Myf5</i> , <i>MyoD</i> and <i>Myogenin</i> expression in <i>Pitx2</i> mutants. ....	cxxxvi
Figure A2.S2. Number and proliferation of limb myogenic progenitors is unaffected in <i>Pitx2</i> mutants. ....	cxxxvii
Figure A2.S3. <i>MyoD</i> core enhancer (CE) and proximal region (PR) contain three putative Pitx binding sites that bind Pitx2. ....	cxxxviii
Figure A2.S4. <i>MyoD</i> recovery occurs similarly in limbs of <i>Pitx2<sup>-/-</sup>:Pitx3<sup>-/-</sup></i> and <i>Pitx2<sup>-/-</sup></i> mutants. ....	cxxxix
Figure A2.S5. Unaltered <i>Myf5</i> ( $\beta$ -galactosidase) expression in limbs of <i>Pitx2<sup>-/-</sup>;Myf5<sup>nLacZ/nLacZ</sup></i> mutants. ....	cxli
Figure A2.S6. Impaired differentiation in hypaxial myotome in absence of <i>Pitx2</i> and <i>Myf5/Mrf4</i> . ....	cxlii



## Listes des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP : antéro-postérieur

AP2 : *activating protein 2*

AR acide rétinoïque

BMP : *bone morphogenetic protein*

CAE : crête apicale ectodermique

Cre : *Cyclization Recombination enzyme*

CRE: *Cis regulatory element*

CTCF: *CCCTC-binding factor*

Cyp : Cytochrome P450

DBD : *Deoxyribonucleic acid binding domain*

Dkk1 : *Dickkopf-related protein 1*

Dnmt: *DNA methyltransferase*

DV : dorsoventral

en : *engrailed*

Fgf : *fibroblast growth factor*

Fgfr : *Fgf receptor*

Gli : *isolated in glioblastoma*

Grem : Gremlin

Hand : *Heart- and neural crest derivatives-expressed protein*

Hox : *homeobox*, homéodomaine

LIM : *Lin-1, Isl-1, and Mec-3 conserved domain*

Lmx : LIM *homeobox transcription factor*

Lrp6 : *Low-density lipoprotein receptor-related protein 6*

Meis : *meiotic S gene*

Msx : *muscle segment homeobox*

neo : *neomycin*

PD : proximodistal

Pax : *Paired homeobox*

Pitx : *Pituitary homeobox*

Prmt: *Protein methyltransferase*

Prx : *Paired related homeobox*

Sp : *Specificity protein*

Tbx : *T-box*

XT : *extratoes*

ZAP : zone d'activité polarisante

## Remerciements

Je tiens à remercier Jacques, qui, en m'hébergeant dans son laboratoire ces dernières années, m'a permis d'explorer un sujet passionnant dans des conditions extraordinaires. Travailler avec quelqu'un d'aussi enthousiaste est un vrai bonheur, et son acharnement pour combattre mon pessimisme naturel, jusqu'à la fin (!), aura été salutaire. Sa patience, sa générosité et son humanité sont des trésors inestimables en science, surtout au quotidien. Je me sens privilégié d'avoir pu te côtoyer pour toutes ces années agréables et enrichissantes. Et quel privilège cela aura été d'aller avec toi à de multiples conférences scientifiques, si importantes pour dans mon cheminement. Merci!

Si mon passage au laboratoire m'a tant apporté scientifiquement et humainement, c'est aussi grâce au contact des personnes de grande qualité qui ont composé son équipe au fil des années. J'ai beaucoup appris à mes débuts grâce à l'influence de membres du laboratoire; 1<sup>ière</sup> génération - Vincent, Emilie, Aurélio, Éric, Mario, Anne-Marie, Maria; ceux de la deuxième génération auront aussi contribué à mon cheminement - Julien, Olivier, Lionel, Steve, David, Catherine et particulièrement Aurore. Enfin, ceux de la troisième génération auront peut-être eu à me « subir » plus que les autres, mais je les ai appréciés tout autant; Marisol, Audrey, Konstantin.

J'ai aussi une pensée toute spéciale pour ces pauvres stagiaires/étudiants qui ont travaillé avec moi, Jean-François, Anthony, Marisol et Antoine, qui m'ont permis d'apprendre, à leurs dépens peut-être (!), les aléas

de l'encadrement. Je remercie aussi ceux qui m'ont aidé au quotidien dans le laboratoire; Michel Chamberland, Lise Laroche, Yves et Johanne et Renée.

Je remercie aussi Muriel Aubry, qui m'a fait confiance pour enseigner pendant plusieurs années aux étudiants en biochimie, une expérience qui aura galvanisé mon amour de la science et de sa communication.

Je m'en voudrais de ne pas souligner particulièrement les amitiés que j'ai tissées pendant ces années avec des membres de l'institut, surtout Damien, Olivier, Vincent, Emilie, Julien, Marisol, Audrey, Romain, Konstantin, Vasanth, Aurélio, Benjamin et Pierre-Étienne.

Mais par-dessus tout, je suis extrêmement redevable à mes parents et mes deux chéries, Aurore et Gabrielle, sans qui tout ceci aurait été plus difficile. Aurore est une collègue de qui j'ai tellement appris et avec qui j'ai la chance de continuer cette aventure. Une compagne extraordinaire qui m'a offert la plus géniale des petites filles. Leur simple présence aura suffi à me garder équilibré. La vie avec vous est un pur plaisir.

À vous tous qui m'avez aidé, encouragé, supporté et questionné, vos opinions et vos connaissances m'auront permis d'apprendre et de me questionner constamment, un privilège unique pour un scientifique.

Merci

... et aux milliers d'innocentes souris, désolé!

*La patience triomphera,*

Sagesse d'un biscuit chinois anonyme.

# CHAPITRE 1

## Chapitre 1 : Introduction

### 1.1 L'étude du développement des membres – le préambule

L'élaboration progressive d'une structure organisée est un problème central en embryologie. Les membres, par leur accessibilité, sont particulièrement aptes à la manipulation expérimentale et de ce fait, ont permis de révéler plusieurs concepts fondateurs en biologie du développement. De l'étude des propriétés des morphogènes à la dissection de complexes cascades (aussi bien signalétiques que transcriptionnelles), l'étude des membres a permis de proposer plusieurs mécanismes fondamentaux régissant le développement de cette structure, mais aussi l'embryogenèse en général. On peut penser au modèle de la zone de progression (Summerbell et al. 1973), qui proposait que les cellules du membre acquièrent leur identité positionnelle selon un axe donné en fonction d'un mécanisme soumis à l'action d'une horloge interne qui, malgré une récente remise en question (Dudley et al 2002, Sun et al 2002, Saunders et al 2002), a marqué une révolution dans le domaine et a influencé d'autres domaines de la recherche en biologie du développement (Dale et Pourquoié 2000).

Le membre est un organe constitué de plusieurs tissus spécialisés (os, muscle, tendons, nerfs vaisseaux sanguins) qui participent de manière

concertée à la fonction qui lui est propre, que ce soit la locomotion (marche, vol ou la nage) ou la préhension, avec différents degrés de puissance et de précision. Il est important de souligner que la structure de base des membres des vertébrés est conservée depuis la divergence des nageoires, avec une même organisation générale en trois segments. Dans cette thèse, je m'intéresserai donc d'abord à détailler les données expérimentales caractérisant le plan général de formation des membres (*bauplan*), c'est-à-dire les mécanismes généraux permettant l'élaboration spatio-temporelle de ces appendices en trois segments. Ceci servira de préambule au sujet central de cette thèse qui se concentre autour d'un mécanisme déployé dans les membres qui est à la base de l'identité des membres.

En outre, il apparaît évident que la sélection naturelle opérant durant l'évolution a permis d'obtenir différentes morphologies de membres, spécialisant celui-ci pour la tâche à accomplir. Si l'on peut distinguer les différentes espèces sur la base des caractéristiques morphologiques propres à leurs membres, un même individu porte aussi des membres différenciés, et ce, même chez les quadrupèdes; les membres antérieurs sont différenciés des membres postérieurs, d'où la notion d'identité des membres. Ces appendices sont donc un modèle de choix pour définir des mécanismes qui ont été mis en place durant l'évolution pour créer de la diversité morphogénétique.



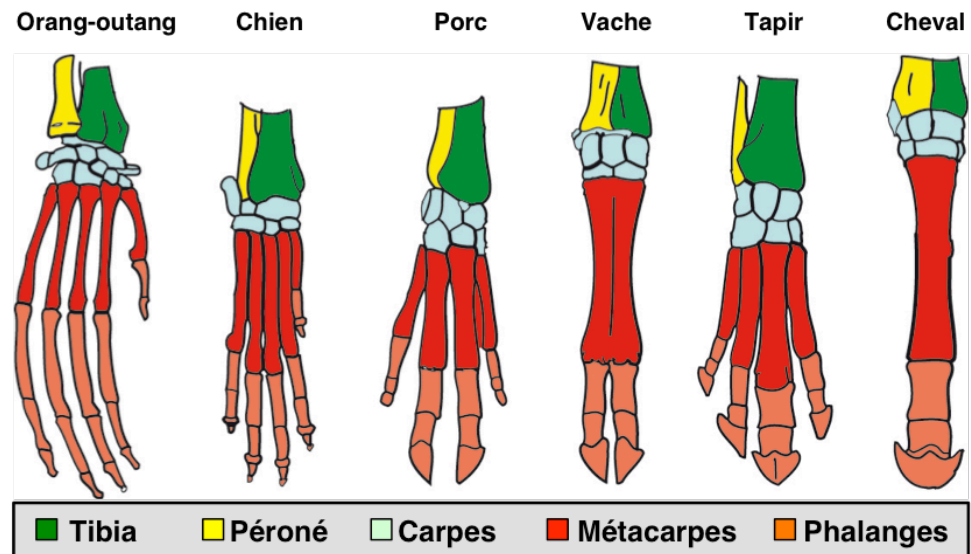
## 1.2 Mécanismes généraux de développement des membres

Il existe une homologie évidente entre les membres, que l'on compare les membres antérieurs et postérieurs d'une même espèce, ou à travers les vertébrés. Dans son livre *Sur l'Origine des Espèces au moyen de la Sélection Naturelle, ou la Préservation des Races les meilleures dans la Lutte pour la Vie*, Darwin écrit :

*« What can be more curious than that the hand of a man, formed for grasping, that of a mole for digging, the leg of the horse, the paddle of the porpoise, and the wing of the bat, should all be constructed on the same pattern, and should include similar bones, in the same relative positions? »* (Darwin 1859)

Ceci en résumé décrit sa fascination envers l'homologie structurelle des os des membres de différentes espèces en regard de l'usage particulier qu'en ont celles-ci (pour exemple, voir Fig. 1.1). Cet état de fait laisse présager de l'existence de mécanismes généraux et conservés dirigeant la formation des membres.

Chez tous les tétrapodes, il existe une organisation conservée, où le segment proximal, le stylopode, est constitué d'un seul os qui s'articule avec le segment médial, le zeugopode, constitué de deux os, qui eux vont aussi s'articuler avec le segment distal, l'autopode (voir Fig. 1.4). Afin d'expliquer cette conservation dans l'organisation des membres, Woogder, reprenant un terme de l'allemand, introduisit la notion de l'existence d'un *bauplan* (plan de travail) pour expliquer l'homologie (d'un organe) entre les espèces: « *Now*



**Figure 1.1 Homologie du squelette de la main des mammifères.**

Illustration de l'organisation commune du squelette de la main de différents mammifères. En dépit du nombre variable d'éléments osseux, les différents segments formant la main sont conservés. (Adapté de Julius 1885-1890).

*consider any particular set of parts of some life and the set consisting of it and all the sets in other lives which are isomorphic with, which are all isomorphic with one another, a Bauplan »* (Woodger 1945). C'est donc à la description des mécanismes généraux permettant l'élaboration d'un membre (chez les tétrapodes, avec comme modèles principaux d'études, la souris et le poulet) que les sections suivantes s'adressent, avec d'abord une parenthèse sur l'origine/l'apparition de ces appendices.

### **1.2.1 Apparition et évolution des membres**

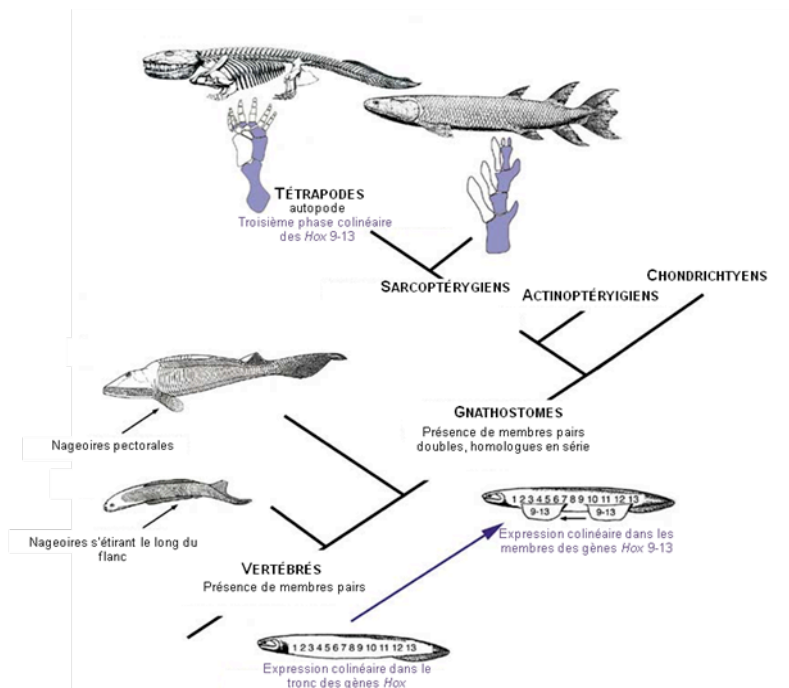
La locomotion des vertébrés est dans l'ensemble assurée par des membres pairs reliés au corps par les ceintures, pectorale pour les membres antérieurs et pelvienne pour les postérieurs (nageoires pectorales et pelviennes, pattes, ailes), mais aussi chez certaines espèces de poissons, par des membres impairs qui sont articulées directement avec le squelette axial (nageoires dorsales, anales et caudales). Il est intéressant de noter que si les plus anciens fossiles de vertébrés étaient dépourvus de membres pairs, ils possédaient des nageoires dorsales et anales bien développées. De fait, ces structures semblent avoir été centrales dans le raffinement des mécanismes permettant le développement des membres pairs, une hypothèse soutenue depuis la reconnaissance qu'elles sont générées par des mécanismes similaires à ceux gouvernant le développement des membres des vertébrés actuels (Freitas et al. 2006). En effet, l'étude des nageoires dorsales

(membres impairs) des petites roussettes (*Scyliorhinus canicula*), appartenant à la classe des poissons cartilagineux qui sont à la base de l'embranchement des chordés, a révélé une étonnante conservation des mécanismes morphogénétiques des membres en général. D'une part, la croissance de ces nageoires dorsales dépend d'une structure apicale ou d'une crête, comme chez les membres pairs. D'autre part, les gènes régulant le positionnement des membres semblent aussi impliqués dans le positionnement de ces nageoires dorsales. Enfin, on retrouve le profil d'expression colinéaire de gène *Hox*, une caractéristique importante de la morphogenèse des membres pairs (Freitas et al. 2006). Ces données suggèrent donc une mise en place des membres pairs subséquente au recrutement d'un programme génétique primitif, même si l'on ne peut exclure que ces observations soient dues à une évolution convergente des membres pairs et impairs ou à un recrutement aux nageoires dorsales d'un programme préalablement mis en place dans des membres pairs suivi de la perte ultérieure de ces structures dans cette espèce. Si l'on est tenté de voir au travers de ces observations l'origine de la conservation des mécanismes morphogénétiques, via le recrutement récurrent des cascades génétiques, il apparaît aussi l'idée d'un programme génétique central contrôlant la croissance des membres et plus globalement, de différents appendices. Il devient alors intéressant de comprendre l'origine des membres.

L'observation des fossiles et des empreintes permet d'entrevoir une histoire sur l'apparition et l'évolution des membres (sur une période remontant

à 463-359 millions d'années; Fig. 1.2), même si elle est ponctuée de zones grises et constamment bouleversée (Niedzwiedzki et al. 2010). Il apparaît que les chordés primitifs, comme l'amphioxus, étaient dépourvus de membres alors que chez certains sont apparus des membres impairs. Des besoins accrus en locomotion auraient vraisemblablement sélectionné positivement diverses formes d'appendices qui méritent d'être considérées relativement à l'origine des membres. Certaines espèces ont porté des nageoires s'étirant le long de leurs flancs (par exemple chez *Jamoytius kerwoodi*); ces structures, selon de la théorie « *fin fold* » ou Thatcher-Mivart-Balfour, seraient à l'origine des nageoires (Coates 2003). À l'inverse, la théorie de Gegenbauer repose plutôt sur l'existence d'un membre primordial, nommé « *archipterygium* », dérivant d'une arche branchiale et qui serait, d'après sa théorie originale, à l'origine de toutes les formes de membres pairs.

Certaines espèces auraient été uniquement pourvues de nageoires (paires) pectorales (comme *Hemicyclospis*), ce qui a laissé à penser que les nageoires pelviennes seraient apparues ultérieurement (Romer 1966; Carroll 1988; Coates 1994). En effet, la présence de deux paires de membres est observable ultérieurement, chez les gnathostomes, des vertébrés avec une mâchoire cartilagineuse dérivée de la première arche branchiale (Fig. 1.2). À travers diverses étapes de bricolage (*tinkering* selon Jacob 1977), une transformation à l'intérieur d'une lignée de poissons « tétradopomorphes » aurait permis la transition des nageoires vers les membres pairs pourvus de



**Figure 1.2 Évolution des membres pairs.**

Les membres pairs sont observables chez des vertébrés sous la forme de nageoires allongées sur les flancs et de nageoires pectorales. L'apparition de plus d'une série de membres pairs est présente chez les poissons pourvus de mâchoires, les Gnathostomes. Il est vraisemblable que l'expression colinéaire des gènes *Hox* du tronc ait été conservée/transposée dans ces membres primitifs. L'expression des gènes postérieurs (des groupes 9 à 13) aussi bien dans les membres antérieurs que postérieurs est possiblement dû à la rétro-transposition dans les antérieurs du programme postérieur (Tabin et Laufer 1993). L'évolution de ces membres primitifs a permis la formation d'un axe proximodistal, représenté en mauve, divisé en segments. L'acquisition d'une troisième phase d'expression colinéaire des gènes *Hox* pourrait être à la base de la formation de l'autopode actuel, surmonté des doigts (Sordino et al. 1995). (Adapté de Shubin et al. 1997)

doigts (397-385 Myr; Janvier et Clement 2010). Un intermédiaire, *Sauripterus*, est pourvu du même patron général où l'on retrouve une organisation avec deux segments proximaux surmontés de rayons dermiques.

Si la transition nageoire-vers-membre est bien acceptée, il s'est avéré complexe d'établir les homologues entre certains éléments des nageoires et des membres pairs, si bien qu'on a établi le terme « d'homologies profondes » (traduction libre de « *Deep homology* »; Shubin et al. 1997; 2009). Ce terme fait référence à ces structures qui ne sont pas comparables directement, mais dont les programmes génétiques impliqués dans leur morphogénèse sont conservés.

Pour exemple, la présence des doigts sur les membres a suscité énormément d'intérêt en regard de l'absence d'homologues évidents chez les nageoires primitives. Les doigts ont été considérés comme une « nouveauté évolutionnaire » par opposition à une modification de structure (Sordino et al. 1995). En effet, on note chez les nageoires une absence d'éléments cartilagineux distaux apparentés aux doigts mais plutôt la présence de rayons dermiques. De façon intéressante, le mécanisme permettant la croissance des doigts via une phase spécifique d'expression colinéaire de certains gènes *Hox* semble être conservé chez le poisson-zèbre, qui lui présente des rayons distaux (Ahn et Ho 2008), si bien qu'il conviendrait selon certains de considérer les rayons des nageoires et les doigts comme des homologues distants (Shubin et al. 2009). Mentionnons que le fin mot de l'histoire n'est

toujours pas écrit, l'interprétation du patron d'expression des *Hox* chez ce poisson étant toujours contestée (Woltering et Duboule 2010).

Évidemment, les appendices servant à la locomotion ne sont pas l'apanage des vertébrés et des études phylogénétiques et moléculaires ont permis de trouver des homologies intéressantes entre des espèces extrêmement distantes dans l'évolution qui viennent étoffer plus encore le concept d'homologie distante. Ces similarités sont intrigantes pour autant qu'elles sont observées entre les appendices des vertébrés et des arthropodes, qui ont pourtant suivi une évolution divergente reflétée dans leur anatomie, et ayant un dernier ancêtre commun présumé vieux d'environ 500 millions d'années. Ainsi, on remarque que, malgré une vaste diversité de la morphologie de ce type d'appendice, les mêmes voies signalétiques sont employées pour construire une aile de drosophile ou une patte arrière de souris, voire les cornes des scarabées-rhinocéros (Moczek et Rose 2009). Il semble effectivement que ces voies aient été recrutées dans l'évolution à de multiples reprises et à différents sites embryonnaires pour permettre la croissance d'appendices. Les sections suivantes seront donc consacrées à la description des centres signalétiques du membre en développement et de ces voies morphogénétiques déployées lors de cette phase.



### 1.2.2 Formation du membre

Le membre est issu de la croissance d'une région discrète du mésoderme de la lame latérale vers l'extérieur de l'axe de l'embryon. Sous l'influence de différents centres organisateurs, celui-ci va à la fois croître et acquérir une polarité proximo-distale (PD), antéro-postérieure (AP) et dorsoventrale (DV). Ces axes polaires définissent l'identité positionnelle des cellules du membre et plusieurs travaux ont permis de comprendre les interactions entre les différentes instructions de polarité. Ce sont les cellules d'une partie de la lame latérale, précisément du territoire présomptif du membre, qui vont proliférer et ainsi permettre la formation d'un renflement localisé. Chez la souris, ces renflements sont présents au jour embryonnaire (e) 9,5 entre le 7<sup>ième</sup> et le 12<sup>ième</sup> somite au niveau des bourgeons antérieurs, soit à la frontière cervicale et thoracique, et 0,5 jour embryonnaire plus tard, au niveau des bourgeons postérieurs qui sont compris entre le 24<sup>ième</sup> et le 28<sup>ième</sup> somite, soit à la frontière lombaire et sacrale. Le positionnement approprié du membre à son importance dans la fonction de celui-ci. En effet, parmi les obstacles majeurs pour l'émergence terrestre des tétrapodes, notons la position de la ceinture pectorale et donc du membre. Cette ceinture étant attachée à la base du crâne chez les poissons, son déplacement vers une position plus caudale apparaît essentiel pour éviter la transmission des chocs des pas directement au cerveau. Dans ce contexte, il est très pertinent qu'un déplacement rostral du membre antérieur ait été

observé à la mutation de *Hoxb5* chez la souris (Rancourt et al. 1995) ou à la surexpression de *Tbx3* chez le poulet (Rallis et al. 2005).

Peu après la formation du bourgeon, en plus des cellules dérivées de la lame latérale, des cellules d'origine différentes vont coloniser le membre, dont des cellules migratoires dérivées du dermomyotome. Ainsi, cette masse cellulaire devra acquérir et intégrer une identité positionnelle afin de s'agencer pour former un appendice fonctionnel. Les cellules dérivées de la lame latérale vont contribuer directement à la formation du derme, des tendons, du cartilage et des os présents dans le membre; les cellules dérivées de la crête neurale vont participer à la formation de l'épiderme; des cellules issues des somites vont permettre la formation des masses musculaires, des vaisseaux sanguins et du derme et vont contribuer à la formation de la ceinture pectorale; les projections des cellules du tube neural vont permettre d'établir le réseau neuronal des membres.

La mise en place des différents territoires du membre est étroitement régulée selon les trois axes du membre. L'axe proximodistal est instruit par des signaux venant à la fois de la crête apicale ectodermique (CAE) et du flanc de l'embryon. C'est d'ailleurs l'axe selon lequel la croissance se fait principalement, pour lequel les signaux de la CAE sont essentiels. L'axe dorsoventral est spécifié par l'ectoderme de surface du membre. L'axe antéropostérieur est dicté par une zone discrète, située en bordure postérieure du membre, qui a été nommée zone d'activité polarisante (ZAP). Plusieurs

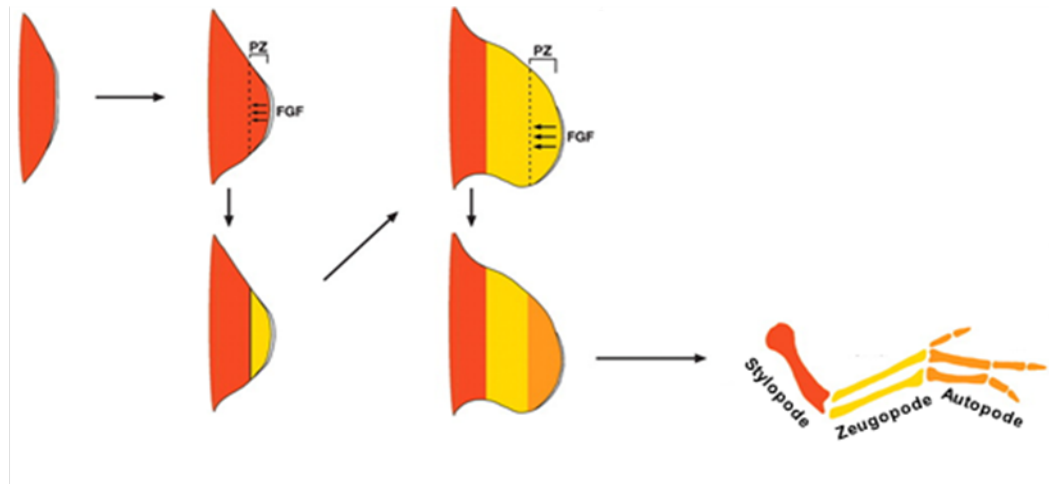
molécules sécrétées par ces centres sont à la base de la croissance des bourgeons, mais aussi de l'instruction positionnelle selon ces axes.

### **1.2.3 La croissance du membre : le rôle de la crête apicale ectodermique**

L'apparition des trois segments osseux composant le membre se produit selon un ordre temporel proximodistal; d'abord le stylopode (humérus ou fémur), ensuite le zeugopode (radius/cubitus ou tibia/péroné) pour terminer par l'autopode (composé des nombreux os de la main ou du pied). Si ces éléments osseux sont dérivés du mésoderme du bourgeon de membre, l'ectoderme sus-jacent est essentiel pour la croissance de ces progéniteurs mésodermiques. En effet, à l'extrémité distale du membre, un renflement de l'ectoderme est présent, exactement à la frontière dorsoventrale du bourgeon, s'étirant le long de l'axe antéropostérieur. Ce renflement nommé crête apicale ectodermique (CAE) secrète des signaux essentiels à la prolifération (Rubin et Saunders 1972) et au maintien des cellules mésodermique du bourgeon (Rowe et al. 1982; Dudley et al. 2002; Sun et al. 2002). L'extirpation de cette structure, par chirurgie chez l'embryon de poulet, cause un arrêt complet de la croissance du membre (Saunders 1948; Summerbell 1974; Rowe et al. 1982). De façon intéressante, il existe une forte corrélation entre le moment de l'extirpation et la perturbation de la croissance proximodistale du membre. Ainsi, les structures proximales seront les seules à être formées à la suite

d'une chirurgie précoce, alors que des structures plus distales seront progressivement récupérées si la CAE est enlevée plus tardivement.

Ces expériences pionnières sont d'ailleurs à la base d'un modèle célèbre de spécification positionnelle, le modèle de la zone de progression (Summerbell et al. 1973), pour expliquer la séquence proximodistale de formation des éléments squelettiques. En effet, à la lumière des résultats observés avec les expériences d'extirpation de la CAE (Saunders 1948), Lewis Wolpert, Julian Lewis et Dennis Summerbell proposèrent que l'identité positionnelle d'une cellule soit spécifiée en fonction du temps d'exposition aux signaux de la CAE, une cellule étant considérée comme exposée aux signaux lorsqu'elle se trouve dans la région subapicale, d'une profondeur estimée de 300 $\mu$ m (voir Fig. 1.3; Summerbell et al. 1973). Supportant ce modèle, on observa qu'une couche subapicale de cellules mésodermiques restait dans un état prolifératif et apparemment indifférencié (Hornbruch et Wolpert 1970). De façon importante, d'élégantes études de chirurgie et de transplantation hétérochronique, chez le poulet, ont servi à démontrer que la nature des signaux de la CAE n'évoluait pas dans le temps, fournissant ainsi un appui à cette hypothèse de spécification «temporelle» du sort cellulaire (Hornbruch et Wolpert 1970; Summerbell et al. 1973). De plus, les greffes hétérotopiques de cette structure ont permis de démontrer que la nature de l'activité ne variait pas en fonction du type de membre (antérieur vs postérieur) (Rubin et Saunders 1972; Kuhlman et Niswander 1997; Fernandez-Teran et al. 1999). Ensemble, ces observations s'accordent avec un modèle où les signaux



**Figure 1.3 Modèle de la zone de progression.**

Selon le modèle de la zone de progression, l'identité proximo-distale des cellules seraient déterminée en fonction du temps passé dans cette zone (PZ), sous l'influence de la crête apicale et de ses signaux (Fgf; *fibroblasts growth factors*). Ainsi les premières cellules à sortir de cette zone auraient un sort proximal et seraient déterminées à former le stylopode. Plus les cellules émergent tardivement de la zone, plus leur sort sera distal (adapté de Tabin et Wolpert 2007).

émanant de la CAE ne sont pas de nature directement instructive pour la spécification de la position proximodistale dans le membre, mais plutôt de nature permissive, gardant les cellules dans un état indifférencié suffisamment longtemps pour qu'elles acquièrent des sorts plus distaux, présumément en fonction d'un mécanisme fonctionnant comme une horloge interne.

Ceci étant, le modèle de la zone de progression a cependant été substitué par un modèle qui tient compte des données moléculaires pour suggérer une spécification PD dépendante à la fois de signaux proximaux et distaux (voir plus bas; (Mercader et al. 2000; Tabin et Wolpert 2007; Mariani et al. 2008). Il n'en demeure pas moins que les travaux pionniers, les idées et les modèles de Lewis Wolpert et de ses collègues ont grandement contribué à l'essor du membre dans la hiérarchie des systèmes d'études des processus de croissance et de spécification.

### **1.2.3.1 La crête apicale ectodermique: formation, maintenance et régression**

Encore une fois, les expériences de greffes hétérotopiques ont permis de reconnaître le rôle du mésoderme de la lame latérale dans l'induction de la formation de la CAE (Kieny 1960). La transplantation de mésoderme du territoire présomptif des membres, sans nécessiter d'orientation particulière, est capable d'induire la formation de la CAE lorsqu'introduite sous l'ectoderme du flanc ou du tube neural (Saunders et Reuss 1974; Carrington et Fallon

1984; Cohn et al. 1995). Il n'est pas invraisemblable que cette capacité soit un vestige d'un programme de formation des nageoires dorsales (Yonei-Tamura et al. 1999; Freitas et al. 2006) et dont les composantes nécessaires pour supporter la formation de la crête soient restreintes au tronc et exclues de la tête (Lours et Dietrich 2005).

La formation de la CAE s'accompagne de la migration de cellules de l'ectoderme ventral qui vont se compacter afin de former un épithélium stratifié. Elle fait intervenir des interactions entre le mésoderme et l'ectoderme qui dépendent de diverses molécules sécrétées de la famille des Fgf, des Bmp et des Wnt (revu par Fernandez-Teran et Ros 2008). Parmi celles-ci, on sait que le territoire présomptif du membre sécrète spécifiquement Fgf10 et que c'est la restriction de l'expression de cette molécule qui permet l'induction aux positions antéro-postérieures appropriées de la crête apicale ectodermique.

La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine est essentielle pour restreindre au territoire présomptif l'expression de *Fgf10* (Kawakami et al. 2001) et pour permettre la formation de la CAE. De fait, l'ablation de *Fgf10*, dans le mésenchyme ou de son récepteur, dans l'ectoderme, empêche la formation du membre (Min et al. 1998; Xu et al. 1998; Arman et al. 1999; Sekine et al. 1999; Gorivodsky et Lonai 2003) et conséquemment, ces souris sont sans membres (*limbless*). Pareillement, divers mutants de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont aussi déficients dans la formation de la CAE (Galceran et al. 1999; Pinson et al. 2000; Barrow et al. 2003; Soshnikova et al. 2003). Chez

l'humain, une mutation menant à un syndrome rare qui résulte en l'absence des quatre membres a été identifiée dans le gène *Wnt3* (Niemann et al. 2004), et dont l'importance dans l'induction de la CAE a été montrée chez la souris (Barrow et al. 2003) et le poulet, mais pour le variant *Wnt3a* (Kawakami et al. 2001; Narita et al. 2005; Narita et al. 2007).

La signalisation Bmp est aussi essentielle dans la formation de la CAE. Par exemple, chez les souris où le récepteur des Bmp, *Bmpr1a*, est spécifiquement inactivé dans l'ectoderme, la CAE ne se forme pas (Ahn et al. 2001). De façon intéressante, ce phénotype peut être compensé par un gain de fonction dans l'ectoderme de la  $\beta$ -caténine (Soshnikova et al. 2003), révélant leur relation épistatique. L'induction de la CAE dépend de l'interaction de ces trois voies de signalisation et des perturbations, dans l'une ou l'autre des voies, entraînent généralement des défauts dans les deux autres.

Si les étapes de maturation et de maintenance ont été moins étudiées, la maintenance de la crête pendant environ deux jours et demi est essentielle pour assurer la croissance du membre. On sait qu'elles nécessitent une interaction avec le mésoderme sous-jacent (Zwilling 1956a; b). En provoquant l'absence de cette interaction, lors d'une transplantation ou d'une isolation physique du mésoderme, la structure stratifiée se perd et la crête régresse. Ceci suggère la présence des facteurs qui entretiennent une signalisation dans la crête essentielle à sa maintenance. À cet effet, la présence de *Fgfr2*, qui permet de recevoir les signaux *Fgf10* du mésoderme, est essentielle pour le maintien de la CAE et son ablation conditionnelle dans les cellules la crête



entraîne sa régression prématurée (Ohuchi et al. 1997; Lu et al. 2008). Une des cibles en aval de cette signalisation pourrait être le gène *Sp8*, un facteur de transcription dont l'expression spécifique dans la crête est requise pour la formation/maturation de la crête et la production de ses signaux (Bell et al. 2003; Treichel et al. 2003). En plus de la signalisation par les Fgf, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est essentielle au maintien de la crête. Pour preuve, l'inactivation de *Wnt3*, mais surtout de la  $\beta$ -caténine, après la formation de la CAE, entraîne des défauts de la crête et accélère sa régression (Barrow et al. 2003). L'implication de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine est aussi observé lors de l'inactivation de *Dkk1*, qui freine normalement la voie, où la crête persiste et où l'apoptose est inhibée, produisant une polydactylie (Mukhopadhyay et al. 2001).

Un aspect important de la biologie de la CAE est le renouvellement constant des cellules la composant, assuré par la régulation de leur mort programmée (Jurand 1965; Todt et Fallon 1984) (Fernandez-Teran et al. 2006). On retrouve d'ailleurs plusieurs mutations influant sur la balance du renouvellement cellulaire (prolifération/apoptose) de la crête apicale. Par exemple, la diminution de l'apoptose dans la crête est suffisante pour créer de la polydactylie (Hinchliffe et Ede 1967; Dvorak et Fallon 1991; Bose et al. 2002). À l'inverse, l'inactivation du récepteur *Fgfr2* entraîne une augmentation de l'apoptose, une régression prématurée de la CAE et la perte d'éléments distaux (Lu et al. 2008). Ces exemples démontrent l'importance du contrôle de l'intégrité durant le développement des membres.

Dans un membre normal, la régression de la crête débute par l'apoptose dans les régions interdigitales, où l'expression des *Bmp* est la plus forte (Ganan et al. 1996; Pajni-Underwood et al. 2007). En effet, en dépit d'un rôle précoce dans l'induction de la CAE, la signalisation par les Bmp contrôle sa régression (Pizette et Niswander 1999). Une dérégulation de la voie Bmp affectera aussi le maintien et la régression de la CAE (Selever et al. 2004). Par exemple, l'inactivation de *Grem1* rehausse signalisation par les Bmp dans le mésoderme du bourgeon et entraîne une régression précoce de la crête (Khokha et al. 2003). À l'inverse, la surexpression de Noggin, un antagoniste de la signalisation par les Bmp, se traduit par un défaut de régression et une persistance prolongée de la CAE (Pizette et Niswander 1999; Guha et al. 2002). Pour cette structure si importante au développement du membre, les études de lignage cellulaire nous montrent qu'aucun descendant de la crête ne persiste chez l'adulte (Guo et al. 2003).

### **1.2.3.2 Les signaux de la crête apicale ectodermique**

Il aura fallu attendre plus de quarante ans entre la reconnaissance de l'activité promotrice de la CAE et l'identification moléculaire de cette activité, alors qu'il a été montré que des *fibroblast growth factor* (fgf) peuvent substituer la crête et supporter la croissance d'un membre (MacCabe et al. 1991). Plusieurs membres de la famille des Fgf ont été identifiés dans la CAE soit Fgf4, Fgf8, Fgf9 et Fgf17, parmi lesquels seuls Fgf4 et Fgf8 peuvent

pallier l'absence de la CAE (Niswander et Martin 1992; Niswander et al. 1993; Fallon et al. 1994; Mahmood et al. 1995; Vogel et al. 1996; Martin 1998). S'il s'est avéré que seule l'inactivation de *Fgf8* entraîne un phénotype des membres (Lewandoski et al. 2000; Moon et al. 2000; Moon et Capecchi 2000; Sun et al. 2002; Boulet et al. 2004), la combinaison des mutants a révélé la nécessité des *Fgf* pour la spécification du domaine distal (Mariani et al. 2008). En effet, une diminution de la dose de *Fgf* entraîne évidemment des tronctions distales du membre, mais n'empêche pas complètement la présence de structures distales (un doigt) directement au bout de l'élément proximal, contrairement aux prédictions du modèle de la zone de progression (Mariani et al. 2008). Ces observations permettent de prendre la mesure des différences de cinétiques d'expressions de ces quatre *Fgf* dans la CAE plutôt que de suggérer un rôle spécifique à chacun. Ainsi, la perte de *Fgf8* entraîne de l'apoptose des cellules du stylo-pode du membre postérieur et non pas directement sous la CAE, menant à la formation d'une jambe sans fémur (Lewandoski et al. 2000), non pas à cause d'un rôle particulier de *Fgf8*, mais plutôt en raison du retard entre l'expression de *Fgf8* et celle de *Fgf4*, plus tardive (Sun et al. 2002).

### **1.2.3.3 Vers un modèle de spécification par des signaux**

À la lumière des récentes études, et aussi en l'absence d'appuis moléculaires pour le modèle de la zone de progression, de nouveaux modèles

pour expliquer la spécification PD ont été mis de l'avant. Un modèle s'appuyant sur des études de lignages cellulaires, le modèle de pré-spécification propose plutôt que les cellules posséderaient leur identité positionnelle PD au tout début de la croissance du bourgeon (Dudley et al. 2002; Sun et al. 2002). Dans ce modèle, la crête fournirait les signaux de croissance nécessaires à l'expansion séquentielle des différentes populations de progéniteurs des trois segments. Par contre, comme pour le modèle de la zone de progression, les évidences moléculaires ne valident pas leurs prédictions (Tabin et Wolpert 2007). Entre autres, malgré l'abondance de patrons d'expressions décrits et d'études par micropuces, aucune étude n'a rapporté de marqueurs de ces populations qui seraient pré-spécifiées. En effet, des études ont permis d'associer l'expression de certains marqueurs à des régions du membre (Meis1/2 au stylopode; HoxA11 au zeugopode; HoxA12 à l'autopode proximale soit les carpes/métacarpes ou tarses/métatarses et HoxA13 aux phalanges des doigts). Ceci étant, l'expression de ces marqueurs est établie bien après la formation du bourgeon et dans selon une dynamique compatible avec la pré-spécification.

En se basant sur une étude pionnière du laboratoire de Miguel Torres (Mercader et al. 2000) et sur les résultats des mutants *Fgfs* (Sun et al. 2002; Mariani et al. 2008), ces auteurs proposent plutôt un modèle qui fait état d'une spécification progressive des cellules indifférenciées du membre dépendant d'un antagonisme entre des signaux proximaux et distaux. Du côté proximal, on invoque l'idée, contestée, d'un signal de l'acide rétinoïque (AR) qui

fournirait une instruction « proximalisante ». D'une part, l'enzyme permettant sa production est exprimé dans le flanc (Niederreither et al. 1997) et la « signalisation » AR-dépendante a été révélée dans toute la partie proximale du membre (Rossant et al. 1991). D'autre part, la formation d'un gradient serait assurée par la présence, distale, de l'enzyme qui permet sa dégradation, *Cyp26*. Ce gradient permettrait d'établir dans le domaine proximal, l'expression des gènes dépendant de l'AR, *Meis1/2*, et l'inactivation de *Cyp26* entraîne une expression plus distale de *Meis1/2* qui s'accompagne par des changements conséquents avec l'adoption de sorts proximaux dans des régions distales (Yashiro et al. 2004). Dans le compartiment médian, le zeugopode, se met en place l'expression de *Hoxa11* dans les cellules qui perçoivent une plus faible signalisation de l'AR. Ainsi, l'expression de *Hoxa11* semble indépendante de l'activité de la CAE, (Hashimoto et al. 1999; Vargesson et al. 2001) mais contrôlée par les niveaux de l'AR (Mercader et al. 2000). À l'inverse, les signaux Fgf de la CAE, essentiels pour la croissance du membre, sont impliqués dans la régulation de marqueurs distaux tels *AP-2*, *Msx1*, *Sprouty2* et *Hoxa13* (Ros et al. 1992; Fallon et al. 1994; Shen et al. 1997; Hashimoto et al. 1999; Vargesson et al. 2001).

En somme, ce modèle fait intervenir des signaux antagonistes qui vont progressivement instruire l'identité des trois segments du membre; le premier qui dépend d'une forte dose de signaux du flanc, le second qui s'établit à des concentrations plus faibles et le plus distal qui dépend à la fois de l'absence de signaux proximaux et de la présence des signaux de la CAE (Tabin et

Wolpert 2007). De ce modèle, notons que le rôle de l'acide rétinoïque est toutefois soumis à controverse suite à une étude qui montre que le développement des membres, et sa spécification PD, peut se dérouler normalement en l'absence de signaux de l'acide rétinoïque (Niederreither et al. 2002; Mic et al. 2004; Zhao et al. 2009b).

#### **1.2.4 La spécification selon l'axe antéropostérieur**

Le membre en développement est aussi sujet à des informations qui assurent sa polarité antéropostérieure et encore une fois, des expériences pionnières de chirurgie chez le poulet nous ont permis d'entrevoir les tenants de cette spécification, la seule à ne pas dépendre directement de l'enveloppe ectodermique (par opposition à l'axe PD et DV). En effet, la greffe d'une région de mésenchyme postérieur dans le territoire antérieur entraîne une polydactylie préaxiale, soit la production de doigts supplémentaire qui sont l'image miroir de ceux normalement présents (situation normale chez le poulet : doigts #2-3-4; avec greffe, doigts 4-3-2-2-3-4) (Saunders 1948; Saunders et Gasseling 1968). Comme pour la CAE, la découverte d'une zone d'activité polarisante (ZAP) est à l'origine d'une série d'études pour disséquer à la fois le rôle de ce tissu que la nature de l'activité qu'il produit.

#### 1.2.4.1 La zone d'activité polarisante

S'il est apparu clair que la région postérieure d'un bourgeon de membre en croissance porte une activité polarisante, plusieurs équipes ont tenté d'expliquer cette propriété. Ainsi, il fut démontré que l'étendue de la production de doigts supplémentaires était proportionnelle à la position du greffon (Tickle et al. 1975) et au nombre de cellules postérieures transplantées (Tickle 1981) corroborant l'hypothèse de Wolpert selon laquelle la ZAP était responsable de la production d'un morphogène dont la distribution dans le membre se fait selon un gradient. Dans sa vision, ce gradient permettrait de spécifier l'identité positionnelle des cellules dans l'axe antéropostérieur et conséquemment, l'identité des éléments osseux du membre dont les doigts en est un exemple probant (Wolpert 1969). Cette idée d'un morphogène dictant l'identité cellulaire pendant le développement est applicable globalement dans tous les tissus, mais de façon intéressante, plusieurs tissus (tel que la notocorde, la plaque ventrale du tube neural, le nœud de Hensen), lorsque greffés dans le compartiment antérieur du membre, sont capables de produire cette même activité polarisante qui entraîne une duplication miroir des doigts (pour exemple, voir (Wagner et al. 1990)). Il s'avère que tous ces tissus produisent la même molécule que les cellules de la ZAP, soit *Sonic Hedgehog (Shh)* (Echelard et al. 1993; Riddle et al. 1993), l'homologue de *hedgehog* chez la drosophile (Lee et al. 1992; Mohler et Vani 1992; Tabata et al. 1992).

Si Shh est indéniablement responsable de l'activité polarisante de la ZAP, la symétrie antéropostérieure est brisée avant même l'expression de

*Shh*. D'une part, l'inactivation de *Shh* entraîne une sévère troncation distale, mais n'empêche pas la mise en place de l'expression polarisée dans l'axe AP de plusieurs marqueurs. Pareillement, les mutants *limbless* chez le poulet ont un défaut qui les empêche de former la CAE et n'induisent pas *Shh*, mais ont toujours l'expression asymétrique des gènes *HoxD* (Grieshammer et al. 1996). De plus, *Hand2*, dont l'expression est retrouvée dans tout le territoire présomptif du membre, est rapidement restreint à la région où l'expression de *shh* sera détectée; l'expression ectopique de *Hand2* dans le compartiment antérieur induit une zone antérieure exprimant *Shh* qui se traduit par la production de doigts surnuméraires (Fernandez-Teran et al. 2000; McFadden et al. 2002). À l'inverse, l'inactivation de *Hand2* empêche l'expression de *Shh* (Charite et al. 2000) et des gènes normalement restreints au compartiment antérieur sont exprimés postérieurement (te Welscher et al. 2002a; te Welscher et al. 2002b).

Un autre facteur, exprimé plus fortement dans le compartiment antérieur, *Gli3*, est induit avant *Shh* (Marigo et al 1996; Masuya et al 1997). La fonction de *Gli3* semble être de restreindre l'expression du programme postérieur (Masuya et al. 1995; Marigo et al. 1996) et sa mutation, dans le mutant naturel *Xt* (pour Extra-toes; Johnson 1967; Schimmang et al. 1992; Hui et Joyner 1993), entraîne une élongation antérieure de la CAE, l'induction ectopique de *Shh* au niveau antérieur et une polydactylie préaxiale. Il est intéressant de mentionner que la protéine *Gli3* est constitutivement protéolysée en une forme plus courte, nommée *Gli3R*, qui joue le rôle d'un



répresseur transcriptionnel et que Shh bloque cette protéolyse pour permettre l'accumulation de la forme pleine longueur, activatrice de la transcription. Le rôle de Shh dans la détermination de l'identité positionnelle AP dans ce contexte semble donc de restreindre la présence de Gli3R (Hill et al. 2009). Précisons que la contribution de Shh dans la polydactylie est n'est pas essentielle puisque les mutants dépourvus de *Gli3* et ceux dépourvus à la fois de *Gli3* et de *Shh* sont phénotypiquement identiques (te Welscher et al. 2002b).

Ceci nous amène à regarder plus attentivement le rôle de ces molécules et de la ZAP dans la spécification antéro-postérieure du membre. D'une part, il semble que l'activité de la ZAP est importante de façon relativement tardive dans le membre; en effet, les effets de l'inactivation de *Shh* sont apparents pour les structures qui sont distales au coude/genou (Chiang et al. 2001). D'autre part, si l'inactivation de *Shh* cause en effet un phénotype assez spectaculaire de troncation distale, l'inactivation supplémentaire de *Gli3* est suffisante pour redonner au membre un aspect plus normal, où l'on retrouve un zeugopode normal et un autopode présentant une polydactylie préaxiale et une perte d'identité des doigts. Enfin, on sait que *Gli3* et *Hand2* (dHand) s'opposent précocement et restreignent leurs expressions respectives dans les compartiments antérieurs et postérieurs, et ce, indépendamment de *Shh* (te Welscher et al. 2002a). Ces résultats ont suggéré une pré-spécification AP du membre et il apparaît probable que les instructions qui établissent l'identité rostrocaudale des structures axiales,

illustrées par l'expression colinéaire des gènes Hox dans le tronc, soient impliquées dans les étapes précoces de la spécification AP du bourgeon de membre (Cohn et al. 1995; Ohuchi et al. 1995; Cohn et al. 1997; Coates et Cohn 1998). À cet effet, l'expression des gènes *Hox*, du groupe A et D, a révélé une expression biaisée dans l'axe AP précédant l'expression de *Shh* (Dolle et al. 1989; Haack et Gruss 1993; Grieshammer et al. 1996; Nelson et al. 1996) qui est requise pour l'induction de *Shh* (Zakany et al. 2004; Kmita et al. 2005). Il semble donc que la voie Shh soit importante pour stabiliser (maintenir) l'identité antéropostérieure qui a été spécifiée avant son expression, et ce, avec une pénétrance plus importante pour les positions distales. D'ailleurs, si l'expression de *Shh* est régulée précocement par l'expression des *HoxD*, c'est plutôt l'inverse qu'on retrouve dans l'autopode, où l'expression de *Shh* régule celle des *HoxD* (Zakany et al. 2004).

Contrairement aux cellules de la crête qui régressent et dont aucun survivant n'est observé dans le membre adulte, les cellules de la ZAP sont impliquées dans la formation des doigts. Le lignage cellulaire des cellules dérivées de la ZAP a permis de mettre en évidence que celles dont l'expression de *Shh* a été la plus courte (descendance précoce) seront recrutées pour former le doigt 3 alors que celles ayant exprimé *Shh* plus longuement formeront les doigts plus postérieurs (Harfe et al. 2004). Il en résulte que l'identité AP Shh-dépendante est fonction du degré d'exposition au morphogène, où il faut à la fois tenir compte de sa concentration, mais aussi de la durée d'exposition à celui-ci (Harfe et al. 2004; Scherz et al. 2007).

Enfin, l'activité polarisante de Shh dépend et s'exerce en même temps que ses effets de stimulation de la prolifération cellulaire (Towers et al. 2008). Il est intéressant de noter que, chez le poulet, où les membres antérieurs sont composés de trois doigts, les cellules de la ZAP ne contribuent à aucun doigt alors que dans les postérieurs, composés de quatre doigts, les cellules de la ZAP contribuent uniquement au quatrième doigt, le plus postérieur (Tamura, Koji, *11th International Conference on Limb Development and Regeneration*, Williamsburgh 2010).

Ces expériences supportent un modèle de spécification AP qui dépend précocement des instructions axiales de polarité, vraisemblablement pour spécifier l'identité AP des segments proximaux, et ultérieurement des signaux de la ZAP, via Shh, pour stabiliser l'identité des segments plus distaux. La conservation des mécanismes d'instructions de polarité AP de Shh, avec des espèces phylogénétiquement très distantes, est observée dans les nageoires paires de certains poissons cartilagineux (Dahn et al. 2007).

### **1.2.5 La spécification selon l'axe dorsoventral**

L'asymétrie dorsoventrale est aussi une caractéristique importante pour la fonction du membre. Elle est évidente chez plusieurs espèces par l'apparence; chez les mammifères, par la présence d'ongles à l'extrémité dorsale des doigts et d'une plus forte densité capillaire sur cette même face; chez le poulet, par un arrangement différentiel des plumes et des écailles. Les

tissus internes ont eux aussi une morphologie et une distribution particulière selon cet axe, tant au niveau des os que des tendons et muscles s'y attachant qu'au niveau des vaisseaux sanguins et nerfs afin de permettre les mouvements nécessaires à la préhension, à la marche ou au vol.

Durant le développement, la frontière dorsoventrale se situe au niveau de la CAE. Ceci étant, on sait que la polarité DV est établie plus tôt, mais les mécanismes exacts demeurent élusifs. Les études de lignage chez le poulet, par l'excision du territoire présomptif des membres et de l'ectoderme sus-jacent et son remplacement par le territoire équivalent de la caille, ont montré que l'ectoderme transplanté se retrouve exclusivement dans la CAE après la formation du bourgeon, les compartiments dorsaux et ventraux étant formés par la migration de cellules de l'ectoderme plus médian et latéral, respectivement (Michaud et al. 1997). Les expériences de chirurgie et de transplantations nous ont appris que le mésoderme présomitique, celui de la lame latérale et l'ectoderme ont tous une influence sur la spécification précoce de cet axe (Kieny et al. 1971; Michaud et al. 1997). En outre, ces auteurs ont suggéré que les somites et le mésoderme de la lame latérale étaient responsables des étapes précoces de l'instruction dorsale et ventrale, respectivement, soit en agissant directement sur le mésoderme du bourgeon, soit en spécifiant l'ectoderme qui recouvre le bourgeon et ainsi imposerait une polarité. De façon intéressante, l'inversion de l'ectoderme sus-jacent à ce stade, soit avant la formation du bourgeon, n'entraîne pas d'inversion de la polarité du membre (Michaud et al. 1997), ce qui est parfaitement en accord

avec l'idée que cette partie d'ectoderme se restreint à la crête apicale et ne participera donc pas à la spécification DV. Par contre, une fois que le bourgeon s'est formé et que des cellules ectodermiques de part et d'autre du champ présomptif ont commencé à recouvrir le bourgeon, l'inversion de l'ectoderme entraîne une transformation de la polarité DV (Pautou et Kieny 1973; MacCabe et al. 1974; Akita 1996). Ceci suggère la présence de facteurs inductifs et instructifs pour l'identité DV et effectivement, l'expression de *Wnt7a* est restreinte à l'ectoderme dorsal. Son inactivation produit des membres « doubles-ventraux » où l'instruction dorsale est absente, avec un effet beaucoup plus pénétrant sur les éléments distaux du membre et des éléments proximaux relativement normaux (Parr et McMahon 1995). Dans l'ectoderme ventral, on retrouve l'expression de *En-1*, l'homologue de *engrailed* chez la drosophile, dont la fonction semble être de réprimer l'expression de *Wnt7a* (Loomis et al. 1996). La signalisation de *Wnt7a* depuis l'ectoderme est essentielle pour induire l'expression du facteur de transcription *Lmx1b* dans le compartiment dorsal du membre, dont le rôle semble être de réprimer un programme ventral par défaut. En son absence, le patron dorsal n'est pas correctement spécifié et le phénotype causé par cette déficience est plus sévère que celui observé en absence de *Wnt7a* (Chen et al. 1998). Cette régulation de l'expression de *Lmx1b* par *Wnt7a* semble dépendre uniquement de la voie non canonique des Wnt (Kengaku et al. 1998) même si la voie canonique, indépendamment de *Wnt7a*, est impliquée dans son activation (Hill et al. 2006). Enfin, le syndrome d'onycho-ostéodysplasie héréditaire (*Nail-*

*patella syndrome*; Chatelain 1820) qui se manifeste par une rotule hypo- ou aplasique, des malformations de la tête du radius et des crêtes iliaques, d'une hypo ou aplasie des ongles des mains et des pieds est causé par une haplo-insuffisance du gène de *LMX1B* (Bongers et al. 2002).

En somme, la spécification dorsoventrale se fait en deux temps; une phase précoce qui semble être indépendante des signaux de l'ectoderme et qui spécifie les segments proximaux alors que la phase tardive dépend des signaux de l'ectoderme pour instruire les segments distaux du membre. Ces deux phases permettent de restreindre l'expression de *Lmx1b* au compartiment dorsal et, si l'on sait que la restriction de *Wnt7a* et *En-1* est essentielle pour l'étape tardive, on ignore toujours les régulateurs de la phase précoce.

### **1.2.6 Intégration tridimensionnelle des signaux par le mésenchyme**

Si les grands axes développementaux du membre sont régulés par différents Fgf, Shh, plusieurs Bmp et des Wnt, ces molécules et leurs voies signalétiques interagissent pour établir la polarité d'une cellule, mais aussi pour réguler la croissance d'un membre. Ces dernières années nous ont permis d'identifier quelques convergences qui fournissent des pistes pour comprendre comment sont reliées ces différentes informations polaires; en fait, c'est maintenant une vision plus intégrée du développement qui est apparue. Par exemple, en plus du rôle classique de Shh dans la

stabilisation/maintien de la polarité AP du membre distal, la signalisation dépendante de Shh est requise pour maintenir l'intégrité de la crête apicale. Celle-ci s'oppose fonctionnellement à la voie Bmp, importante dans la régression de la crête et qui doit être maintenue sous contrôle durant la croissance du membre. On sait maintenant que l'interaction entre la ZAP et la CAE dépend de la régulation par Shh de l'expression de *Grem1*, un antagoniste des Bmp. (Capdevila et al. 1999; Panman et al. 2006) (Khokha et al. 2003; Michos et al. 2004) en plus du maintien de la production de Shh par les Fgf secrétés depuis la crête (Laufer et al. 1994, Niswander et al. 1994). En plus, Wnt7a, sécrété par l'ectoderme dorsal et dont le rôle majeur dans le bourgeon est pour la polarisation DV, est aussi requis pour l'expression de Shh (Parr and McMahon, 1995; Yang et al. 1995). Paradoxalement, bien que toutes ces voies convergent pour bloquer l'action des Bmp via l'induction de *Grem1*, elles participent aussi au maintien des Bmp dans le mésenchyme (Batisda et al. 2009). Il faut donc voir dans ces diverses interactions un système finement régulé, en équilibre dynamique, afin d'assurer la croissance d'un bourgeon de taille et de forme rigoureusement prédéterminée, système qui par ailleurs fournit plusieurs possibilités pour introduire de la variation (au niveau de la taille et forme, eg : Cretekos et al. 2008). Pour parvenir à ces interactions entre les diverses voies, de nombreux facteurs de transcription jouent des rôles dans le contrôle des différents composants signalétiques et de leurs gènes cibles. Parmi ceux-ci, les facteurs de transcription de la famille

des *Hox* semblent présider aux divers évènements de régulation dans le développement du membre.

L'identité rostrocaudale découle d'un code qui semble être basé sur l'expression colinéaire des gènes *Hox* dans le tronc, l'axe embryonnaire majeur. Ainsi, les gènes *Hox*, répartis sur 4 loci (A, B, C, D) en 13 groupes indépendants chez les vertébrés (1 à 13), ont une expression axiale, dans les différents tissus du tronc (par exemple, le tube neural), qui est directement reliée à leur position chromosomique. Les membres étant des axes secondaires rattachés à cet axe central, il n'est pas surprenant de retrouver le même genre d'expression colinéaire de ces gènes (Dolle et al. 1989; Nelson et al. 1996). Ceci étant, la colinéarité observée dans le membre est plus complexe que celle du tronc, se présentant selon différents axes polaires en fonction du stade embryonnaire du bourgeon, mais est restreinte aux gènes postérieurs des différents complexes *Hox* (A à D; des groupes 9 à 13). Ainsi, on retrouve une phase précoce où les gènes montrent une colinéarité directe qui prend la forme d'un gradient d'expression selon l'axe AP dépendant directement de leur position dans le locus ( $Hox9 > 10 > 11 > 12 > 13$ ). Plus tardivement, on retrouve une phase tardive d'expression, au niveau de l'autopode, où les gènes des différents complexes vont s'exprimer avec une colinéarité inverse ( $Hox13 > 12 > 11 > 10 > 9$ ). L'expression des gènes *Hox* des groupes A et D à ce stade de formation du membre est essentielle pour la croissance des membres; son ablation ayant pour effet d'empêcher l'expression de *Shh*, la boucle d'autorégulation entre la CAE et la ZAP n'est



pas initiée et on observe un « arrêt » du développement des bourgeons (Kmita et al. 2005). Cette phase est donc requise pour la génération des éléments proximaux du membre et permet de restreindre *Shh* au territoire postérieur.

À la suite de cette expression initiale biaisée dans l'axe AP, on retrouve dans le bourgeon plus tardif une expression biaisée dont l'axe principal est proximodistal. De fait, c'est sur la base de l'expression des gènes *HoxA/D* et des phénotypes restreints aux compartiments du membre (par exemple la perte de l'élément médial en absence des gènes *HoxA/D* 11; Davis et al. 1995) que le modèle de spécification par signaux proposé par Tabin et Wolpert s'appuie (Tabin et Wolpert 2007). En somme, les gènes *HoxA/D* participe à la fois à l'initiation des cascades signalétiques du membre précocement et aussi à l'attribution plus tardive dans l'identité des segments. Il semblerait aussi qu'ils soient impliqués dans le maintien et l'arrêt des signaux de croissance du membre puisque leur absence entraîne une persistance de l'expression de *Shh*, *Grem1* et *Fgf4* (Sheth Rushikesh, Damien Grégoire, Ma Felix Bastida, Marie Kmita et Maria Ros, *11th International Conference on Limb Development and Regeneration*, Williamsburgh 2010).

Les membres de la famille LIM, soit *Lhx2*, *Lhx9* et *Lmx1b*, ainsi que leur partenaire transcriptionnel *Lbd1*, sont aussi impliqués dans cette convergence (Agulnick et al. 1996). Comme mentionné, l'inactivation isolée de *Lmx1b* entraîne la perte de polarité dorsale (Parr et McMahon 1995). De leur côté, *Lhx2* et *Lhx9* semblent importants et redondants à la fois pour la croissance

selon l'axe PD que pour la spécification dans l'axe AP (Tzchori et al. 2009). En effet, l'inactivation de ces gènes entraîne non seulement une diminution de l'expression de *Fgf10* dans le mésenchyme du bourgeon, mais aussi une réduction de l'expression de *Shh* dans la ZAP (Tzchori et al. 2009). Ces deux effets primaires ont des effets importants pour la croissance du membre, car ils s'ajoutent à une réduction de l'expression de *Grem1*, entraînant un arrêt du développement du membre qui rappelle celui observé en absence de la fonction de gènes *HoxA/D* (Kmita et al. 2005). Ce phénotype est encore plus marqué lors de l'inactivation génique du partenaire transcriptionnel obligatoire de ces facteurs LIM, *Lbd1*, où les trois axes sont perturbés (Tzchori et al. 2009). En plus de ces facteurs, mentionnons que la  $\beta$ -caténine, exprimée aussi dans le bourgeon en formation que dans l'ectoderme, est requise pour la formation et le maintien de la CAE via son rôle dans la transcription de *Fgf10* et possiblement de *Twist*, et que son inactivation cause aussi de sévères troncations du membre (Agarwal et al. 2003). Encore une fois, l'activité de la  $\beta$ -caténine semble réguler la puissance du signal Bmp, via le contrôle de *Grem1* (Hill et al. 2006). Plus complexe encore semble être le rôle des facteurs *Msx1* et *Msx2* dont l'activité en aval des Bmp (Pizette et Niswander 1999) régule à la fois la formation de la CAE, l'organisation AP et la polarité DV dans le territoire antérieur du membre (Lallemand et al. 2005; Lallemand et al. 2009).

En somme, afin de se former correctement, le bourgeon se doit d'être spécifié correctement dans l'axe dorsoventral pour que la crête se forme

correctement, ce qui ultimement dépend de la signalisation Bmp (Pizette et Niswander 1999; Ahn et al. 2001). Cette signalisation semble par la suite jouer un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance et son activité doit être finement régulée; cette fonction est assurée pendant la phase de croissance par *Grem1* (Zuniga et al. 1999; Verheyden et Sun 2008). Ainsi, alors que les signaux de ZAP et de la CAE se maintiennent et permettent à la fois la croissance et la spécification AP et PD, la voie Bmp est gardée sous une inhibition constante. C'est uniquement lorsque les signaux de la CAE et de la ZAP perdent de leur efficacité à se maintenir et ainsi à inhiber les Bmp que ces derniers redeviennent prédominant pour stopper la croissance du membre via la dégénérescence de la crête apicale (Verheyden et Sun 2008). Ce plan de base de formation d'un membre s'appuie donc sur un réseau signalétique et transcriptionnel sur lequel semble converger un ensemble de facteurs. Ainsi, à travers des modulations de ce réseau, locales ou à l'échelle du membre, il devient possible d'altérer la morphologie et même voire l'identité d'un membre. Les prochaines sections s'attardent plus en détail au concept d'identité des membres, au niveau morphologique, mais aussi moléculaire.

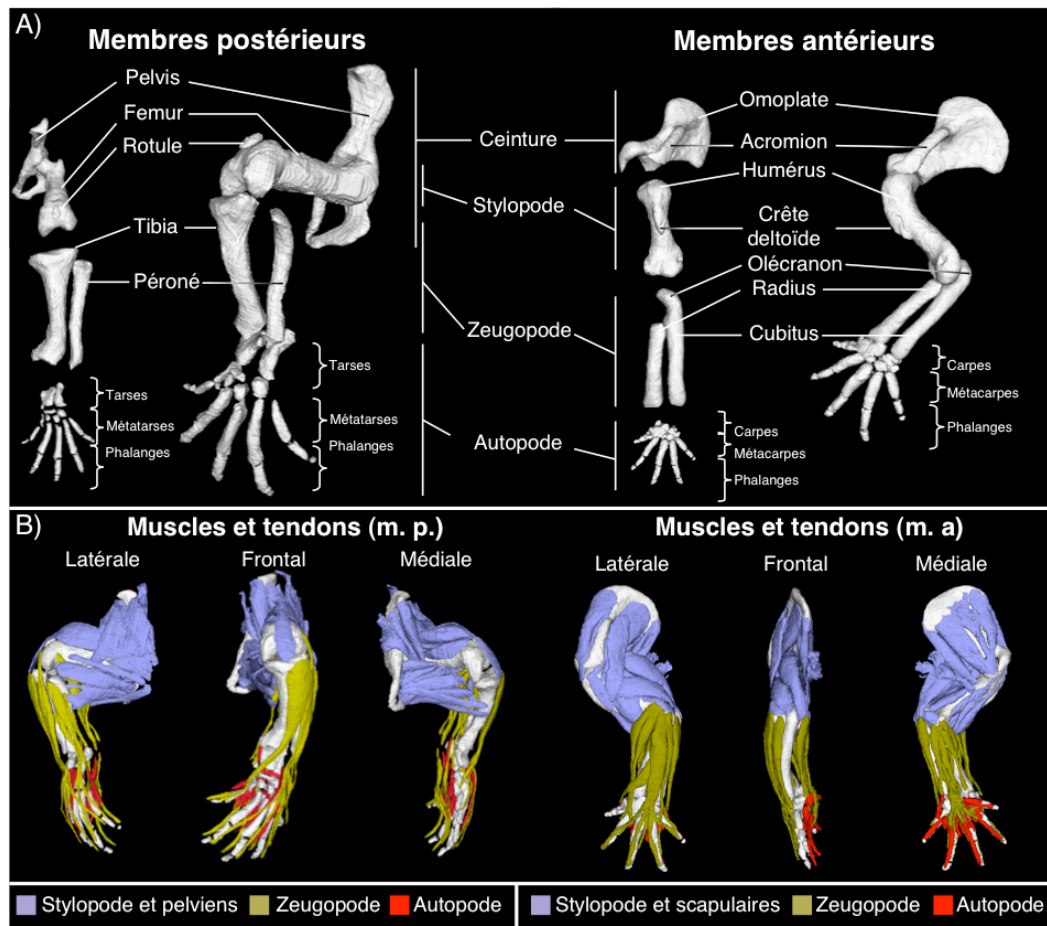
### **1.3 Mise en place de l'identité des membres**

Les membres sont des structures homologues; ils partagent une très grande similarité d'organisation. L'homologie est considérée comme une conséquence de l'implémentation d'un programme conservé à différente (s) localisation (s) embryonnaire (s) (revu par True et Carroll 2002). Cette homologie découle donc de la conservation des mécanismes gouvernant la croissance et la morphogénèse des membres, discutés à la section 1.2. En accord avec l'idée que les membres sont des homologues en série, on constate d'ailleurs que ces appendices partagent des similitudes (Fig. 1.4). Des études d'anatomie comparatives permettent d'ailleurs d'établir des correspondances entre les muscles des membres antérieurs et postérieurs, tant dans la fonction que dans la position (Humphry 1872; Greene 1963). Malgré cela, il existe des différences dans l'agencement de ces tissus au sein des membres et ceci vraisemblablement grâce à l'interprétation différentielle de ces signaux de croissance et de polarité. Ainsi, de nombreuses différences morphologiques permettent d'établir les identités antérieures et postérieures spécifiques, et je m'efforcerai d'illustrer quelques-unes des différences squelettiques (Fig. 1.4).

#### **1.3.1 Différences morphologiques**

Les membres sont issus de bourgeons qui émergent sur le flanc de l'embryon à des positions rostrocaudales bien précises. Ces bourgeons vont

se développer pour former des appendices morphologiquement et fonctionnellement similaires, mais présentant tout de même des différences. Une des différences les plus frappantes est la différence de morphologie des os des ceintures, qui permettent l'attachement du membre au squelette axial. En effet, il est difficile de considérer l'homologie entre la ceinture pectorale, formée de l'omoplate et de la clavicule, et pelvienne, composé de la hanche. Celles-ci sont d'ailleurs formées par des mécanismes embryonnaires différents et sont dérivées de tissus embryonnaires différents (Kieny 1964b). Si on considère le stylo-pode qui est composé d'un seul os, l'humérus ou le fémur, on remarque des particularités qui reflètent des différences fonctionnelles. L'humérus possède une crête deltoïde qui permet l'attachement d'un tendon, une structure qui n'a pas d'équivalent au niveau du fémur. En outre, la présence de condyles plus développés est un trait distinctif de la tête distale du fémur, qui s'articule avec le zeugopode au niveau du genou, une articulation largement différente du coude. En effet, alors que le coude se définit par l'interface des trois os longs du bras (humérus, radius et cubitus), l'interface principale du genou implique seulement le fémur et le tibia. Une des différences principales semble être sur la tête des deux homologues du zeugopode, le cubitus et le péroné; alors que le cubitus est large et possède l'olécranon, qui épouse la tête distale de l'humérus, le péroné est plus mince et ne se prolonge pas assez pour contacter le fémur. Ainsi, ces différences du coude et du genou participent aux différences de préhension et de force de ces articulations. De plus, des points d'attache tendineux uniques



**Figure 1.4** Structure des membres antérieurs (m. a.) et postérieurs (m. p.) d'embryons au jour embryonnaire 14.5 représenté grâce à la tomographie par projection optique.

**A)** Représentation squelettique des membres antérieurs et postérieurs alignés selon l'homologie des segments (vue frontale à gauche et latérale à droite). **B)** Représentation superposée au squelette des muscles et des tendons, groupés en segments. Généré à l'aide de JAtlas Viewer (Feng et al. 2005).

au genou, entre autres avec la rotule et les condyles du fémur, permettent d'accommoder la musculature plus importante de la jambe et ainsi de supporter une charge supplémentaire.

En dépit de plusieurs homologues évidentes entre les os de la main et du pied, on remarque aussi des différences localisées surtout dans la partie proximale du pied, où les tarses sont plus développés que les carpes. De plus le calcanéum, qui ancre le tendon d'Achille, et par conséquent le gastronémien et le soléus, prend une position qui est dans le plan du pied alors que le pisiforme, qui est son équivalent carpien, est plutôt perpendiculaire au plan de la main. Cette dernière distinction est vraisemblablement liée à la différence d'angle entre le zeugopode et l'autopode qui est de 180 degrés pour le bras et seulement de 90 degrés pour le pied (sur la face dorsale). Enfin, notons que, chez les aviaires, même le revêtement ectodermique est spécifique d'une identité (les plumes pour l'antérieure comparativement aux écailles pour la postérieure).

L'accessibilité des membres chez le poulet a permis une série d'expériences classiques de microdissections, d'amputations, de greffes hétéro-topique ou -spécifique ont permis de questionner les mécanismes de spécification de leur identité. De fait, les premières expériences pour aborder cette problématique ont été réalisées sur des embryons de salamandres où un greffon du territoire présomptif du membre inséré ectopiquement sur les flancs de l'embryon poursuit normalement son développement (Harrison 1918), observation qui a été reproduite ultérieurement chez le poulet (Hamburger

1938). Le fait qu'un territoire présomptif d'aile, lorsqu'extirpé puis transplanté dans un site ectopique, soit capable de se développer pour former une aile normale démontre bien la nature intrinsèque de l'identité ainsi que sa stabilité (ou son « indifférence » aux signaux axiaux). Il est intéressant de constater qu'un tissu de membre (ex : stylo-pode de la jambe) conserve toujours son identité, même lorsque greffé sous une CAE d'identité différente (aile) (Zwilling 1955; 1956a), alors que cette même crête peut reprogrammer sa spécification proximodistale (transformation du stylo-pode vers l'autopode) (Saunders et al. 1957; Saunders et Gasseling 1959). À l'inverse, le mésoderme d'une jambe est capable de transformer l'identité de l'ectoderme de surface provenant d'une aile. Enfin, la greffe de tissus de bourgeon antérieur sur un bourgeon postérieur génère un membre « hybride » ou chimérique avec des éléments caractéristiques des deux types d'identité (Saunders 1948; Kieny 1964a). Le résultat de ces expériences a pavé la voie aux embryologistes moléculaires pour la découverte du (des) facteur (s) responsable (s) de l'identité des membres; l'activité responsable de l'identité est intrinsèque aux cellules du mésenchyme de bourgeon de membre et est mise en place très tôt dans le développement, soit avant la formation du bourgeon.



### **1.3.2 Identification de facteurs impliqués dans la spécification et la détermination de l'identité des membres.**

C'est en cherchant à l'aide d'une réaction en chaîne de polymérisation avec des oligonucléotides dégénérés pour trouver des gènes possédant un domaine de liaison à l'ADN apparenté à celui de *Brachyury* ou *T* (nommé boîte T) que les deux premiers gènes à l'expression restreinte au membre antérieur ou postérieur ont été découverts (Agulnik et al. 1996; Chapman et al. 1996). Les premiers indices que *Tbx4* et *Tbx5* jouaient un rôle dans l'identité des membres sont venus lors de la description de leurs patrons d'expressions embryonnaires. En effet, en plus d'expressions communes dans l'allantochorion, le cœur et les poumons, il apparut que *Tbx5* était exprimé seulement dans les membres antérieurs alors que *Tbx4* l'était dans les membres postérieurs. Un autre genre de crible, pour trouver des protéines se liant à un élément conférant une expression spécifique au gène de la proopiomélanocortine dans les cellules hypophysaires corticotrophes a permis de cloner *Pitx1* (Lamonerie et al. 1996) et son expression fut ultérieurement montrée comme étant restreinte d'abord à la région postérieure du mésoderme de la lame latérale et en définitive au mésenchyme du bourgeon de membre postérieur (Lanctôt et al. 1997). Ces profils d'expression spécifique semblent conservés au cours de l'évolution des tétrapodes, autant chez les mammifères que chez les amphibiens et les poissons (Chapman et al. 1996; Li et al. 1997; Simon et al. 1997; Gibson-Brown et al. 1998b; Takabatake et al. 2000; Ahn et al. 2002; Tickle et Cole 2004).

Les gènes *Tbx4* et *Tbx5*, qui encodent des facteurs de transcription, sont des paralogues vraisemblablement issus de la duplication du gène ancestral *Tbx4/Tbx5*, toujours présent dans des espèces à la base de l'arbre phylogénétique des chordés, l'amphioxus étant un représentant vivant de ce groupe (Agulnik et al. 1996; Putnam et al. 2008). Le gène *Pitx1* encode pour un facteur de transcription de la super famille des homéodomaines et possède deux paralogues, *Pitx2* et *Pitx3*, qui participent tous au développement embryonnaire et qui partagent une activité redondante dans certains tissus (Suh et al. 2002; Marcil et al. 2003; Charles et al. 2005; L'honoré et al. 2007). En accord avec les expériences de transplantions précédemment énumérées (Zwilling 1955; 1956a; b), l'expression de *Pitx1*, *Tbx4* et de *Tbx5* est déjà mise en place avant l'initiation de la croissance du bourgeon (Lanctôt et al. 1997; Saito et al. 2006), est maintenue indépendamment du lieu de la greffe (Gibson-Brown et al. 1998a; Isaac et al. 1998) et est exclue de l'ectoderme (Gibson-Brown et al. 1998b).

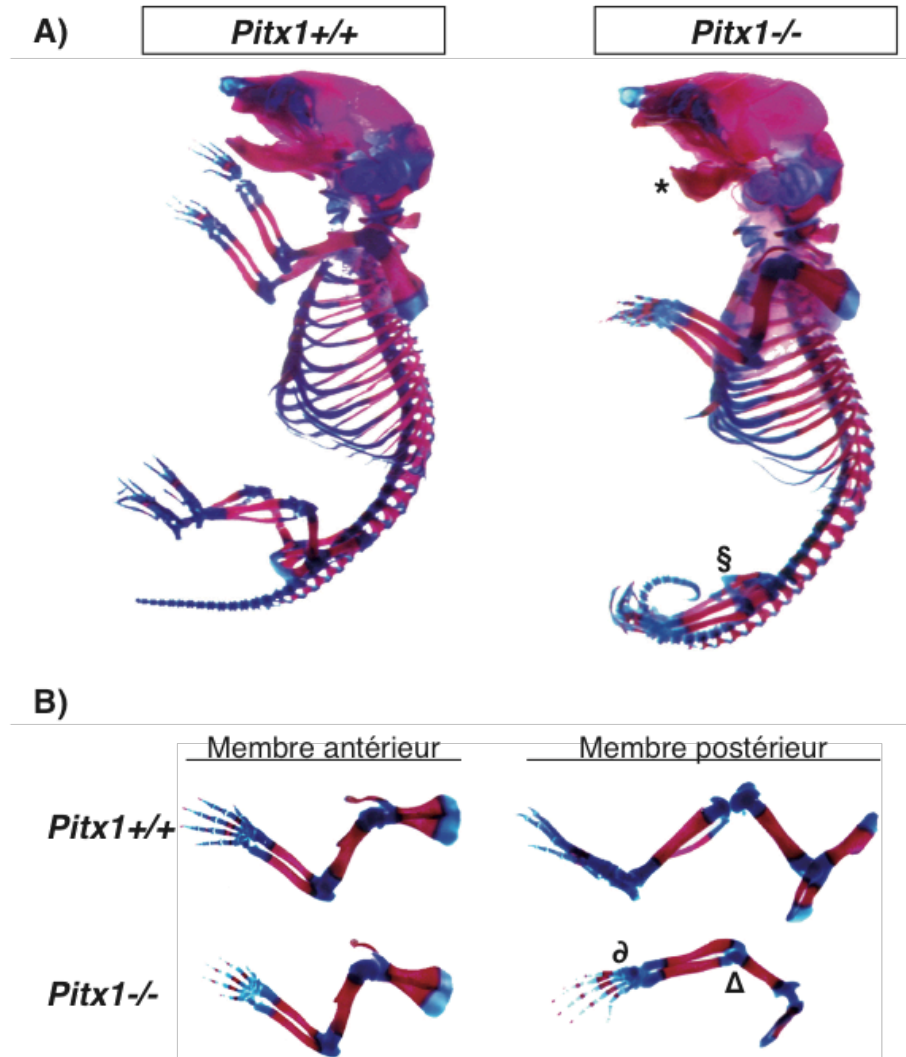
Les profils d'expression de *Tbx4* et *Tbx5* ont permis d'établir une cinétique de la mise en place de l'identité des membres, de différencier temporellement la spécification, la détermination et la différenciation. L'identité est dite spécifiée à un stade où la différenciation peut se faire de façon autonome, mais le sort est toujours réversible. La détermination est mise en évidence quand la cellule ou le tissu peut assumer sa destinée indépendamment du contexte, un stade où le sort n'est plus réversible (Slack 1991; Wolpert et al. 1998). La différenciation permet quant à elle d'acquérir les

caractères et d'assumer sa fonction finale, observable pour un tissu et pour une cellule par des changements morphologiques et/ou biochimiques. Appliqués à l'identité d'un membre, les deux premiers états peuvent être explorés grâce aux expériences de transplantation chez le poulet; la spécification mise en évidence par la conservation de l'identité dans un environnement « neutre », à la place du tube neural tandis que la détermination est mise en évidence lors d'une transplantation à proximité du membre de l'autre identité (Saito et al. 2006). Ainsi, la spécification se fait très tôt chez le poulet (autour du stade 9) alors que la détermination est évidente plus tardivement, surtout pour les membres postérieurs (autour du stade 13). Ces expériences ont permis de constater que l'identité d'un bourgeon est déjà spécifiée avant l'expression de Tbx4 et Tbx5 et que ces gènes seraient des marqueurs de la détermination de l'identité (Saito et al. 2006). Il est vraisemblable que Pitx1 soit impliqué dans l'étape de spécification puisque son expression débute dès la formation du mésoderme de la lame latérale (Lanctôt et al. 1997).

Les premières expériences supportant un rôle actif de Pitx1, Tbx4 et Tbx5 dans la spécification de l'identité des membres sont venues grâce aux études de surexpression chez le poulet et d'inactivation dans les membres (Lanctôt et al. 1999; Logan et Tabin 1999; Rodriguez-Esteban et al. 1999; Szeto et al. 1999; Takeuchi et al. 1999). En effet, ces expériences sont venues apporter des évidences que Pitx1 et Tbx4 étaient impliqués dans la spécification de l'identité postérieure et Tbx5, de l'identité antérieure.

### 1.3.2.1 *Pitx1* est en amont des processus d'identité et de croissance des membres postérieurs

En plus de révéler sa nécessité dans la formation des structures faciales dérivées de la première arche branchiale, l'inactivation de *Pitx1* entraîne un défaut du développement des membres postérieurs de la souris. Le phénotype le plus évident est celui de la réduction de la taille des membres, tel qu'illustré sur les préparations squelettiques, en particulier au niveau du fémur et des tarse de l'autopode; ceci est déjà évident à des stades précoces de la croissance (Fig. 1.5; Lanctôt et al. 1999; Marcil et al. 2003). Cette perte de croissance du fémur est d'ailleurs moins pénétrante à gauche, ce qui a laissé supposer une compensation de l'absence de *Pitx1* par *Pitx2*, compensation mise en évidence en combinant l'allèle mutant de *Pitx1* avec divers allèles mutants de *Pitx2* (*Pitx2<sup>neo</sup>* et *Pitx2<sup>null</sup>*). Grâce à ces outils génétiques, une dépendance à la dose des facteurs *Pitx1* et *Pitx2* a été révélée pour la croissance du bourgeon de membre, et ce allant même jusqu'à l'arrêt de la croissance de celui-ci juste après l'initiation de la croissance, en absence complète de deux facteurs (*Pitx1*<sup>-/-</sup>; *Pitx2*<sup>-/-</sup> : Marcil et al. 2003). Notons que la dépendance aux *Pitx* semble être encore plus



**Figure 1.5 Phénotype des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup> au niveau de la mandibule et des membres postérieurs.**

A) Les souris déficientes en *Pitx1* montrent une agénésie de la mandibule (\*) ainsi qu'un défaut au niveau des membres postérieurs. B) Défauts des membres postérieurs (§) qui comprennent une perte de la croissance, des cartilages du genou ( $\Delta$ ) et des défauts des tarses ( $\delta$ ). Adapté de (Lanctôt et al. 1999).

grande dans le compartiment antérieur du membre, tel qu'observé avec la perte liminaire du tibia et du doigt #1.

Le rôle essentiel de *Pitx1* dans la croissance semble avoir été adopté tôt dans l'évolution et a été confirmé grâce à l'analyse de certaines populations d'épinoche (*Gastrophysus aculeatus*) d'eau douce. Une réduction pelvienne importante est observée dans ces populations et les analyses génétiques d'association ont montré que le locus de fréquence majoritaire pour ce trait est celui de *Pitx1*, en plus des loci de fréquences mineures, de *Pitx2* et *Tbx4* (Shapiro et al. 2004). L'étude approfondie du locus montra que la séquence codante de *Pitx1* est intacte, mais qu'il y a une délétion en amont du gène, dans un élément régulateur essentiel à l'expression de *Pitx1* dans les nageoires pelviennes (Chan et al. 2010).

À l'instar de la croissance, la spécification de l'identité postérieure est perturbée en absence de *Pitx1*. En effet, plusieurs caractères morphologiques spécifiques de l'identité postérieure sont perdus (Fig. 1.5), alors que d'autres sont transformés en caractères spécifiques de l'identité antérieure sur les pattes arrière des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>, et ce, sans gain du marqueur moléculaire de l'identité antérieure, *Tbx5*. La perte de l'os iliaque, qui relie le membre postérieur au squelette axial, simplifie la hanche et fait en sorte que c'est l'acétabulum qui contacte la colonne vertébrale, entraînant un déplacement rostral du membre et son alignement avec la première vertèbre sacrale, non plus avec la troisième. Plusieurs cartilages secondaires sont perdus au niveau du genou de sorte que, avec la perte de la rotule, l'articulation ressemble plus

à un coude qu'à un genou (Fig. 1.5). Une autre transformation s'opère en absence de *Pitx1* qui implique le calcanéum, un os tarsien dont la morphologie dans le mutant s'approche de celle du pisiforme, son homologue carpien de la main. Ces défauts squelettiques ont mené à la conclusion que *Pitx1* était le gène sélecteur de l'identité des membres (Lanctôt et al. 1999; Szeto et al. 1999). La perte d'identité postérieure en absence de *Pitx1*, et qui laisse même à penser à une transformation partielle vers l'identité antérieure sans l'induction de marqueur moléculaire spécifique à celle-ci, suggère l'existence d'un programme par défaut qui spécifierait l'identité d'un membre. Ce programme, s'il existe, serait révélé dans les membres postérieurs des mutants *Pitx1* et dicterait les caractères que l'on retrouve dans les membres antérieurs. Dans un tel contexte, le rôle de *Pitx1* dans l'identité semblerait être celui d'un modulateur de ce programme permettant l'expression de caractères postérieurs (Lanctôt et al. 1999; Szeto et al. 1999).

Les expériences de surexpression précoce chez le poulet montrent aussi que *Pitx1* est en amont des processus de spécification de l'identité postérieure alors que sa seule surexpression dans les bourgeons antérieurs suffit pour observer une transformation vers l'identité postérieure (Logan et Tabin 1999; Szeto et al. 1999). La surexpression précoce de *Pitx1* dans les bourgeons antérieurs chez la souris amène aussi une transformation, moins pénétrante que chez le poulet, de la morphologie squelettique; le plus grand changement osseux chez ces souris au niveau des bras est la régression de l'olécranien, structure présente sur la tête proximale du cubitus (DeLaurier et

al. 2006). L'homologue du cubitus des pattes arrière, le péroné, ne possède que très peu de cartilage secondaire sur l'extrémité proximale et le changement observé sur le cubitus est suggestif d'un changement d'identité. En plus des changements squelettiques observés dans les expériences de surexpression chez le poulet et la souris, on observe aussi un changement de patron des masses musculaires et des tendons (Logan et Tabin 1999; DeLaurier et al. 2006). Il est intéressant de noter que ces changements de patrons musculaires sont imputables à un rôle instructif de *Pitx1* depuis le mésenchyme de la patte, chez la souris à tout le moins, puisque la stratégie expérimentale utilisée ne dirige pas a priori l'expression ectopique de *Pitx1* dans les dérivés musculaires (Logan et al. 2002; Hasson et al. 2010).

Ces changements morphologiques provoqués par l'altération de l'expression de *Pitx1* s'accompagnent aussi de changements moléculaires. Parmi ceux-ci, notons qu'un gène cible en aval de *Pitx1* ayant été identifié dans ces expériences, *Tbx4*. Son expression dépend directement de l'expression de *Pitx1*, si bien que, dans les expériences de surexpression, il est induit, alors que, lors de l'inactivation de *Pitx1*, son expression diminue (Lanctôt et al. 1999; Szeto et al. 1999; DeLaurier et al. 2006); en contrepartie, celle de *Tbx5* n'est jamais affectée par la présence ou l'absence de *Pitx1*. De plus, la surexpression de *Pitx1* chez le poulet induit de l'expression de *Hoxc10* et *Hoxc11* (Logan et Tabin 1999). En dehors de ces gènes, aucun autre gène montrant des différences significatives d'expression n'a pu être identifié. Par contre, on observe un retard de formation de la crête apicale ectodermique



dans les souris où l'expression de *Pitx1* et *Pitx2* est compromise, sans que la voie précise responsable de ce défaut n'ait été formellement identifiée (Marcil et al. 2003). Enfin, une mutation de *PITX1* a été retrouvée chez un enfant atteint de pied bot varus équin congénital (« *clubfoot* » ou *talipes equinovarus*), qui entraîne des malformations des jambes, confirme que le rôle de *Pitx1* dans le développement des membres postérieurs est conservé chez l'humain (Gurnett et al. 2008).

### **1.3.2.2 *Tbx4* et le développement des membres postérieurs**

L'expression restreinte de *Tbx4* dans les membres postérieurs de poulet et de souris a suggéré son implication dans les processus de détermination de l'identité des membres (Chapman et al. 1996; Gibson-Brown et al. 1996; Gibson-Brown et al. 1998b). De la même façon l'identité d'un membre ectopique, induit par exemple suite à l'ajout de Fgf sur le flanc, peut être déterminée avec l'expression de *Tbx4* (Gibson-Brown et al. 1998a; Isaac et al. 1998; Ohuchi et al. 1998). Dans ces mêmes expériences, si le membre induit présente une identité chimérique, résultat d'une induction sur la frontière antéropostérieure du flanc, l'expression de *Tbx4* sera restreinte au compartiment d'où émergera la partie d'identité postérieure. Ceci étant, l'expression de *Tbx4* est plus restreinte que celle de *Pitx1*; alors que *Pitx1* est exprimé dans toute la partie postérieure du mésoderme de la lame latérale, et ce bien avant la croissance du bourgeon postérieure, celle de *Tbx4* est

délectable tout juste avant l'initiation du bourgeon (Saito et al. 2006), à un moment où l'identité d'un greffon de territoire présomptif de la patte est stable (déterminée), peu importe l'endroit d'implantation (Stephens et al. 1989; Gibson-Brown et al. 1998a).

Une expérience pionnière de surexpression par électroporation de vecteurs rétroviraux chez le poulet vint apporter la preuve que *Tbx4* module l'identité des membres. En forçant son expression très tôt dans le mésoderme antérieur de la lame latérale, bien avant l'initiation du bourgeon, Takeuchi et collègues ont observés une transformation de l'identité de l'aile vers une morphologie qui ressemble à celle de la patte (Takeuchi et al. 1999). Un autre groupe a montré qu'en forçant l'expression de *Tbx4* dans des cellules de flanc situé près de l'aile, l'identité d'un membre ectopique qui normalement est antérieure est convertie pour être plutôt postérieure (Rodriguez-Esteban et al. 1999). Mentionnons toutefois que la seconde étude rapporte que la surexpression de *Tbx4* au niveau prospectif de l'aile entraîne la plupart du temps des pertes d'éléments squelettiques, suggérant que la dose de facteurs *Tbx4/5* est importante pour suivre un développement normal (Rodriguez-Esteban et al. 1999). Néanmoins, ces résultats ont mené à un modèle où *Tbx4* est un déterminant de l'identité postérieure.

Les expériences de surexpression et d'inactivation chez la souris n'ont toutefois pas produit de résultats confortant ce modèle. En effet, la surexpression chez la souris ne suffit pas à convertir l'identité d'un membre antérieur (DeLaurier et al. 2006). De plus, le remplacement génétique de *Tbx5*

par *Tbx4* permet la formation d'un membre antérieur presque normal; seule l'expression additionnelle de *Pitx1* dans un tel contexte suffit à conférer une identité postérieure au membre antérieur (Minguillon et al. 2005). Ces dernières expériences plaident plutôt en faveur d'un modèle où *Tbx4* est un effecteur essentiel de la croissance.

L'inactivation de *Tbx4* chez la souris produit aussi un phénotype évident de défaut de croissance (Naiche et Papaioannou 2003; 2007). La perte complète *Tbx4*, létale une journée après la formation du bourgeon de membre postérieur, n'empêche pas la formation du bourgeon de membre, mais, en explants, ces bourgeons ne croissent pas autant que des bourgeons sauvages en culture (Naiche et Papaioannou 2003). Il apparaît que l'absence de *Tbx4* n'empêche pas l'induction de *Fgf10*, mais plutôt sa maintenance. Cette relation épistatique se révèle aussi lors de l'expression de la protéine de fusion *enTbx4*, un dominant négatif, dont l'introduction dans un bourgeon de membres postérieurs abroge sa croissance et peut même produire un phénotype *limbless* (Takeuchi et al. 2003). Ainsi, cette protéine dominante négative réprime l'activité des séquences régulatrices proximales de *Fgf10* (Bruneau et al. 2001; Takeuchi et al. 2003). Enfin, il a été aussi montré que *Tbx4* seul pouvait suffire à induire la croissance d'un membre, lorsque surexprimé dans le flanc de l'embryon de poulet (Takeuchi et al. 2003), même si cette propriété ne s'est pas confirmée chez la souris (Minguillon et al. 2005).

L'inactivation conditionnelle à l'aide d'un système inductible de *Tbx4* au jour embryonnaire (E) 7,5 permet de repousser la mort embryonnaire et a

confirmé l'importance précoce de *Tbx4* dans la croissance du bourgeon; en son absence, la formation de la CAE est sévèrement compromise, *Hand2* est réduit et *Shh* n'est pas induit (Naiche et Papaioannou 2007). L'inactivation conditionnelle depuis E9,5 compromet beaucoup moins la formation du bourgeon postérieur, mais entraîne quand même des malformations et pertes squelettiques proximales, ce qui n'est pas sans rappeler le phénotype des mutants *Fgf8* (Lewandoski et al. 2000). Ceci ne s'accompagne toutefois pas de changements morphologiques qui pourraient suggérer une transformation/perte d'identité postérieure. À l'aide de la *Prx1-Cre*, qui cible l'expression de la recombinaison dans le mésoderme de la lame latérale et dans ses dérivés dont spécialement le mésoderme des bourgeons (Logan et al. 2002), on observe que la délétion de *Tbx4* avant la formation du bourgeon entraîne la perte de l'os iliaque, du fémur et de la rotule, des cartilages de la tête proximale du tibia, du péroné et des défauts de formation de la branche pubienne et des tarse (Naiche et Papaioannou 2007). Le phénotype le plus surprenant est l'inversion complète de la rotation du membre, si bien qu'au lieu de faire une rotation ventromédiale qui place le pied sous le corps de la souris, celui-ci fait la rotation inverse, plaçant de fait le membre à 180° de sa position normale. Le patron des masses musculaires et des tendons est aussi dépendant de l'expression de *Tbx4*, qui modulerait la stabilité de la  $\beta$ -caténine et de la N-cadhérine (Hasson et al. 2010). Le rôle proposé sur la fonction de *Tbx4* est qu'il serait impliqué pour l'initiation et la maintien de la croissance du bourgeon postérieure, mais que son inactivation ne serait pas suffisante pour

empêcher ces étapes (Naiche et Papaioannou 2007). L'étude des éléments de régulation de *Tbx4* dans les membres postérieurs a d'ailleurs raffiné ce rôle présumé de *Tbx4* dans la croissance; la délétion d'un élément de régulation entraîne une diminution d'environ 60% du messager de *Tbx4* se répercute sur la croissance et cause de légères, mais significatives, diminution de taille des éléments osseux des pattes arrière (Menke et al. 2008).

Récemment, diverses mutations dans le gène *TBX4* ont été identifiées dans des patients atteints du syndrome coxo-podopatellaire qui entraînent une malformation de la hanche, une hypoplasie ou aplasie de la rotule et qui entraîne une malformation de l'hallux, le premier doigt de pied (Bongers et al. 2004). Dans tous les patients rapportés, la mutation était présente à l'état hétérozygote, comme pour la plupart des maladies causées par des mutations dans les boîtes T, l'exception étant pour le déficit isolé en hormone adrénocorticotrope causé par des mutations dans le gène *TPIT* (Pulichino et al. 2003). De plus, des microduplications comprenant le gène de *TBX4* ont été retrouvées chez des patients atteints du pied bot (Alvarado et al. 2010), comme pour *PITX1*, apportant une confirmation supplémentaire à la relation d'épistasie entre ces gènes.

### **1.3.2.3 Le rôle de *Tbx5* dans les membres antérieurs**

L'expression de *Tbx5* dans la lame latérale est restreinte au territoire présomptif des membres antérieurs et se poursuit dans le bourgeon de

membre pendant son développement (Chapman et al. 1996). Tel que mentionné précédemment, son expression précède légèrement le stade de détermination de l'identité du territoire antérieur et précède aussi les premières manifestations anatomiques des bourgeons antérieurs. Comme pour *Tbx4*, le rôle de *Tbx5* dans le développement des membres a été circonscrit grâce à des manipulations génétiques chez le poulet et la souris, mais aussi chez le poisson-zèbre. Par le biais d'expériences de gain de fonction chez le poulet, *Tbx5* a été identifié comme un régulateur de la détermination de l'identité antérieure. En effet, la surexpression de *Tbx5* suffit à re-spécifier l'identité d'un membre (Takeuchi et al. 1999), bien qu'une autre étude a rapporté qu'une telle manipulation engendrait majoritairement des pertes d'éléments squelettiques (Rodriguez-Esteban et al. 1999). Les études ultérieures dans d'autres organismes n'ont pas permis de confirmer cette fonction présumée de *Tbx5* dans le contrôle de l'identité antérieure. Ainsi, comme pour *Tbx4*, la surexpression chez la souris n'entraîne pas de conversion d'identité des membres postérieurs (Minguillon et al. 2005).

Le rôle de *Tbx5* dans la croissance des membres antérieurs a été largement étudié et sa fonction semble conservée à travers les tétrapodes. Chez la souris, son inactivation provoque l'absence complète de membres antérieurs; la croissance ne semble pas s'ébranler, ou à tout le moins s'arrête juste après l'émergence d'un renflement. La formation de la crête n'est pas détectée et l'expression de *Fgf10* n'est jamais initiée dans le territoire antérieur. On a retrouvé dans les séquences régulatrices de *Fgf10* plusieurs

éléments de liaison pour les boîtes T et l'une d'entre elle semble conférer la sensibilité à *Tbx5* dans des essais de transfections transitoires (Agarwal et al. 2003; Koshiba-Takeuchi et al. 2006). Par ailleurs, il semblerait que le promoteur de *Tbx5* contienne des éléments de réponse à la  $\beta$ -caténine, impliquée dans l'initiation de la croissance des bourgeons, et les études génétiques ont confirmé la conservation de la relation épistatique entre ces voies chez le poisson-zèbre, la souris et le poulet (Ng et al. 2002; Agarwal et al. 2003; Takeuchi et al. 2003). Cependant, l'absence de *Tbx5* n'entraîne pas de problème dans les étapes précoces de spécification de l'axe antéropostérieur, révélé par un patron normal de *Hand2* dans le territoire présomptif.

L'inactivation conditionnelle dans le temps de *Tbx5* a permis de montrer qu'il était requis seulement surtout pour l'initiation de la croissance, vraisemblablement en démarrant la boucle d'autorégulation entre l'ectoderme et le mésenchyme, essentielle à la formation de la CAE, via l'initiation de *Fgf10* (Hasson et al. 2007). Sa délétion passée cette étape critique n'entraîne pas de délétion du membre, contrairement à ce qui peut être observé en enlevant la CAE, laissant supposer que la boucle d'autorégulation entre la crête et le mésenchyme du membre, qui dépend de *Fgf8* et *Fgf10*, ne nécessite pas *Tbx5* pour être maintenue. Ainsi, une fois l'activation de *Fgf10* entreprise, *Tbx5* ne semble plus indispensable pour la croissance PD du membre. Il faut cependant préciser et nuancer puisque la délétion « post-initiation » de *Tbx5* entraîne tout de même de légers retards de croissance,

évidents sur chaque segment du membre et un déficit de croissance de l'omoplate et de la clavicule. Mentionnons que des mutations du gène *TBX5* ont été retrouvées dans le syndrome pléiotropique Holt-Oram, qui produit diverses manifestations cliniques au niveau des membres antérieurs, qui peuvent aller d'une malformation subtile au niveau des carpes jusqu'à la phocomélie (condition où les segments proximal et distal sont atrophiés).

#### **1.3.2.4 Intégration du rôle de *Pitx1*, *Tbx4* et *Tbx5* dans le développement des membres**

Les différentes expériences détaillées dans les sections précédentes apportent des données parfois convergentes et parfois conflictuelles. Ainsi, le modèle de spécification et de détermination de l'identité qui se dégage ne peut pas intégrer toutes les données des diverses espèces. À l'exception d'une étude controversée chez le poulet, il semblerait que ni *Tbx4* dans les postérieurs, ni *Tbx5* dans les antérieurs ne soient requis pour établir l'identité du membre. Tel que mentionné précédemment, le remplacement fonctionnel de *Tbx5* par *Tbx4* est compatible avec la formation du membre antérieur; ces résultats argumentent en faveur d'un modèle où *Tbx4* et *Tbx5* ne sont pas impliqués/indispensables *in vivo* dans les processus de spécification ou de détermination des membres, mais partagent plutôt des fonctions dans l'induction de la croissance. L'échange de domaines entre *Tbx4* et *Tbx5* (par exemple, N-terminal de *Tbx4* avec la boîte T et le C-terminal de *Tbx5*)



n'influence en rien la capacité de la protéine chimérique à combler l'absence de *Tbx5* et à permettre la croissance des membres postérieurs (Minguillon et al. 2009). D'ailleurs, le gène *amphiTbx4/5*, version ancestrale considérée comme un précurseur des deux gènes, partage aussi cette propriété de formation du membre antérieur. Il semble donc que *Tbx4* et *Tbx5* partagent une fonction ancestrale qui leur permet d'enclencher le programme de formation d'un membre, propriété qui pourrait vraisemblablement dépendre uniquement de l'induction de *Fgf10*. Un tel scénario laisse envisager l'existence d'un programme par défaut, d'un *bauplan*, pour la formation d'un membre qui prendrait alors la forme/identité antérieure et dans lequel serait inclus une fonction « croissance » de *Tbx4/Tbx5*. Si ces deux gènes sont présentement considérés comme équivalents, c'est plutôt à *Pitx1* qu'on attribue des fonctions dans la mise en place de l'identité des membres. *Pitx1*, dont l'expression est restreinte aux membres postérieurs, pourrait donc agir sur le *bauplan* et ainsi conférer des caractères uniques, composants de l'identité postérieure.

De façon intéressante, *Tbx4* et *Tbx5* ne se comportent pas *in vivo* de manière identique. Par exemple, alors que la délétion de *Tbx5* est totalement incompatible avec la formation d'un bourgeon antérieur, celle de *Tbx4* n'empêche en rien la formation du bourgeon postérieur et malgré d'importants défauts de croissance, les membres issus de ces bourgeons ont toujours trois segments reconnaissables. Une explication potentielle serait une dépendance différentielle de *Tbx4* et *Tbx5* envers *Sall4*. En effet, *Sall4* dont l'expression

est requise pour celle de *Fgf10* semble être en amont de *Tbx4* dans les membres postérieurs, mais en aval de *Tbx5* dans les antérieurs (Koshiba-Takeuchi et al. 2006), révélant une dépendance et une implication différentielle dans les réseaux transcriptionnels déployés lors du développement d'un membre.

Par ailleurs, alors que *Tbx5* se comporte comme un activateur transcriptionnel dans tous les contextes où son activité a été investiguée, l'activité de *Tbx4* ne semble pas aussi tranchée. Étrangement, en infectant des bourgeons de poumons avec une fusion *Tbx4*-VP16, déléetée du C-terminal de *Tbx4*, on augmente l'expression endogène de *Fgf10* beaucoup moins qu'avec la forme normale de *Tbx4* (Sakiyama et al. 2003). Ceci semble paradoxal (la fusion VP16 est beaucoup plus compétente dans l'activation du promoteur de *Fgf10*) et à laisser à penser aux auteurs que l'induction de *Fgf10* par *Tbx4* pourrait nécessiter autant une fonction activatrice que répressive de *Tbx4* (Sakiyama et al. 2003). Dans cette optique, il devient intéressant de s'intéresser aux propriétés transcriptionnelles des facteurs *Tbx4* et *Tbx5*.

#### 1.4 Les gènes à boîtes T

La première manifestation de l'existence des gènes de la famille des boîtes T fut rapportée en 1927 avec l'isolation, dans un criblage d'induction de mutations par exposition aux rayons X d'une souris. Cette étude génétique pionnière rapporta une mutation, *T*, qui à l'état hétérozygote entraîne une troncation de la queue (brachyurie) et dont l'homozygoté est létale. Les études subséquentes chez les souris homozygotes montrèrent un problème de fusion entre l'allantoïde et le cône ectoplacentaire (Gluecksohn-Schoenheimer 1938), vraisemblablement à l'origine de la létalité embryonnaire, ainsi qu'une absence de spécification du mésoderme et conséquemment, des structures axiales postérieures. En effet, si la somitogénèse se fait correctement jusqu'au niveau des membres antérieurs, un arrêt apparent de la formation de la notocorde et un défaut du sillon primitif se produit vers le 8<sup>ième</sup> jour embryonnaire (Chelsey 1935). D'autres allèles mutants furent découverts et de nombreuses études établirent ainsi ce modèle comme pionnier dans le domaine de la génétique développementale. D'ailleurs, le gène responsable de la brachyurie fut l'objet des premiers efforts de clonage positionnel et fut finalement isolé en 1990. Il s'avéra que le gène *T* ou *Brachyury* code pour une protéine nucléaire (Schulte-Merker et al. 1992), qu'elle lie l'ADN (Kispert et Herrmann 1993) et est capable de réguler la transcription (Kispert et al. 1995). La protéine T peut lier l'ADN sur une séquence définie comme le palindrome *Brachyury*, dont la séquence

consensus est CTAGT(G/C) ACACCTAGGTGTGAAATT, sous forme de monomère (Kispert et Herrmann 1993).

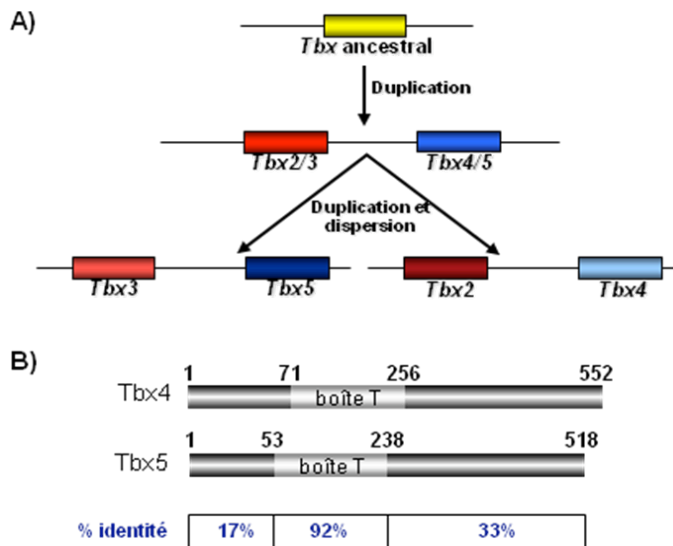
La découverte de ce nouveau facteur de transcription amorça la recherche de membres apparentés à T. En effet, sur la base du nombre relativement restreint de motifs de liaison à l'ADN, la découverte de la boîte T laissait présager l'existence d'une famille de gènes partageant ce même domaine. La découverte en 1992 d'un nouveau gène de la drosophile nommé *optomotor blind (omb)*, qui partage une grande identité de séquence dans son domaine de liaison à l'ADN, vint confirmer cette prédiction (Pflugfelder et al. 1992a; Pflugfelder et al. 1992b). Par la suite, de nombreux travaux rapportèrent la découverte de nouveaux membres de ce qu'il convint d'appeler la famille des facteurs de transcription à boîte T. Ces facteurs ont donc en commun un domaine de liaison à l'ADN, nommé boîte T, composée d'environ 180 acides aminés; la cristallographie de Tbx3 a montré l'importance de plusieurs résidus dispersés (Coll et al. 2002). La reconnaissance de sa séquence cible fait intervenir des interactions hydrophobes avec le sillon mineur de l'ADN (Muller et Herrmann 1997; Coll et al. 2002). La boîte T est par ailleurs flanquée de domaines N- et C-terminaux, porteurs des fonctions d'activation ou de répression de la transcription.

L'inactivation d'autres membres de la famille des boîtes vint nourrir les études de plusieurs phénomènes développementaux. À l'instar de *Brachyury*, des mutations dans les gènes codant pour ces facteurs à boîtes T, autant chez la drosophile, le poisson-zèbre, la souris que chez l'humain entraînent de

profondes perturbations développementales. Plusieurs syndromes humains ont été associés à des mutations dans ces gènes; en plus de ceux nommés précédemment, on retrouve des mutations/délétions de *TBX1* dans le syndrome de DiGeorge et le syndrome vélocardiofacial, de *TBX3* dans le syndrome radiomammaire, de *TBX15* dans la dysplasie pelvi-scapulaire familiale avec anomalies épiphysaires (Syndrome de Cousin; Cousin et al. 1982; Lausch et al. 2008), de *TPIT (TBX19)* dans le déficit corticotrope, de *TBX21* dans des lymphopathies (dont la maladie de Hodgkin) et de *TBX22* dans des cas de fente palatine.

Enfin, les analyses phylogénétiques des différentes boîtes T apportèrent un complément aux études des gènes *Hox* dans notre compréhension de l'évolution du génome des vertébrés (Ruvinsky et Gibson-Brown 2000). Par exemple, la comparaison du génome de l'amphioxus (*Branchiostoma floridae*) et celui de l'humain ou de la souris révèle une duplication génomique et en particulier, ceci est évident dans la famille des boîtes T; pour la famille *Tbx2* (Fig. 1.6), deux gènes sont présents chez l'amphioxus, *amphiTbx2/3* et *amphiTbx4/5*, contre quatre chez les mammifères (Putnam et al. 2008). Par ailleurs, il existe un seul homologue de cette famille chez la drosophile, *omb* (Pflugfelder et al. 1992a).

Avec la duplication des gènes de cette famille, si importants pour les processus développementaux, il apparaît évident que de nouvelles identités cellulaires, voire de nouveaux organes, ont pu être dérivées. Ainsi,



**Figure 1.6 Émergence et conservation des facteurs Tbx4 et Tbx5.**

**A)** Modèle pour la mise en place de la sous-famille Tbx2. Du gène ancestral hypothétique, une duplication aurait eu lieu pour générer un locus avec les gènes Tbx2/3 et Tbx4/5, mis en évidence dans les génomes des vertébrés primitifs comme l'amphioxus. Les gènes retrouvés en tandem (Tbx3 lié à Tbx5 et Tbx2 lié à Tbx4) chez les mammifères actuels sont issus de la duplication du locus intermédiaire et d'une dispersion subséquente. **B)** Conservation entre les protéines Tbx4 et Tbx5. Représentation schématique des protéines Tbx4 et Tbx5 et de l'identité de séquence, telle que déterminée avec le programme d'alignement de séquence ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>; Larkin et al. 2007; Delaurier et al. 2008).

l'apparition d'un nouveau gène, d'un duplicata, permet d'accumuler des mutations qui auraient pu à l'origine être délétères pour le gène ancestral. Ainsi, la seconde copie d'un gène peut être 1) inactivée par l'instabilité qu'elle apporte au système, 2) mutée pour acquérir de nouveaux sites d'expressions et/ou de nouvelles fonctions (dans ce cas-ci, les deux copies peuvent subir cette situation) ou 3) l'inverse, soit restreindre ces sites d'expressions ou perdre des fonctions (Force et al. 1999). Dans le cas de *Tbx4* et *Tbx5*, issus de la duplication d'un gène ancestral, il a été proposé justement que ces deux gènes n'ont pas acquis de fonctions spécifiques, mais plutôt qu'ils auraient acquis des territoires d'expression distincts puisque, comme mentionné, *Tbx4* peut remplacer *Tbx5* et supporter la croissance d'un membre antérieur (Minguillon et al. 2009).

#### **1.4.1 Mécanismes de régulation de l'expression génique par les facteurs à boîtes T**

De nombreux travaux ont disséqué l'activité transcriptionnelle des différents facteurs de transcription à boîtes T, révélant ainsi une complexité dans l'action de ces protéines. Les membres de la famille des boîtes T semblent tous jouer des rôles importants lors du développement, autant chez les invertébrés que chez les vertébrés, et des mutations qui affectent leurs activités transcriptionnelles ont été décrites dans différents syndromes humains. Ce rôle dans la différenciation est épigénétique, c'est-à-dire qu'il fait

intervenir des changements de l'état chromatinien, via la méthylation de l'ADN ou des modifications d'histones, et non de l'information génétique *per se*, pour moduler l'expression génique (revus dans Turner 2007).

Or on sait maintenant grâce aux études génomiques sur l'état épigénétique de la chromatine durant la différenciation des cellules souches que les gènes développementaux sont identifiables par la présence de domaines bivalents (enhancers), où se retrouvent à la fois des modifications/marques d'histones activatrices et répressives au sein de leurs séquences régulatrices (Meissner et al. 2008). En effet, on y retrouve des triméthylations de lysines de l'histone H3 qui sont révélatrices d'un domaine actif, sur la lysine 4, ou d'un domaine répressif, sur la lysine 27. La différenciation entraîne soit la perte de la modification H3K4me3 et la stabilisation et la propagation des H3K27me3 prédisposant à l'inclusion dans l'hétérochromatine, soit la perte des H3K27me3 qui rend le domaine compatible avec la transcription.

Un mécanisme de régulation transcriptionnel, décrit pour Tbx21, implique l'interaction avec les complexes H3K27 déméthylases et les H3K4-méthyltransférase et sa boîte T (Miller et al. 2008). Un domaine bivalent a été identifié dans le locus de *Ifn $\gamma$*  dans les cellules T CD4+ naïves; l'activation de ce locus sous l'entrée en différenciation dépend de *Tbx21* qui, grâce à son domaine de liaison à l'ADN, s'associe conjointement avec JMJD3, une K27 déméthylase, et Set7/9, une K4 méthyltransférase afin de déposer des marques épigénétiques compatibles avec la transcription.



L'analyse des différentes mutations des boîtes T associées à des pathologies humaines a permis d'identifier deux domaines qui, bien qu'ils soient à l'intérieur de la boîte T, ne participent pas directement à l'interaction avec l'ADN ni à la transactivation. Par exemple, une mutation retrouvée dans TPIT, I171T (Pulichino et al. 2003) qui n'est pas dans située dans l'interface d'interaction avec l'ADN, a été introduite à la position homologue dans Tbx21; ceci n'empêche ni son recrutement au promoteur endogène de *Irfn $\gamma$* , ni la transactivation de cet élément en transfection transitoire, mais prévient plutôt les modifications des histones présents au locus endogène de *Irfn $\gamma$* , observée avec Tbx21 de type sauvage (Miller et al. 2008). Ainsi, cette mutation suggère un découplage de l'effet épigénétique, permis par l'interaction avec les enzymes modificatrices d'histones (JMJD3 et Set7/9), d'avec la fonction d'activation transcriptionnelle et d'avec la liaison à l'ADN. De façon intéressante, la conservation de ces interfaces « épigénétiques » suggère que ce mécanisme de modulation de l'état chromatinien pourrait être déployé pendant le développement par d'autres membres de la famille.

Un mécanisme possiblement apparenté a aussi été mis en évidence pour Tbx5; on sait que l'interaction avec une sous-unité du complexe Baf, Baf60c, Gata4 et Nkx2.5 est suffisante pour induire la différenciation cardiaque (Takeuchi et Bruneau 2009), révélée par l'activation de l'expression de gènes restreints au muscle cardiaque, en plus de l'induction ectopique d'un phénotype cardiaque dans des cellules mésodermiques commises à un autre lignage (mésoderme postérieur et extraembryonnaire). Cette apparente

transdifférenciation suggère que ce complexe, où *Tbx5* est essentiel, permet de modifier l'état épigénétique des cellules pour les instruire dans un nouveau lignage cellulaire. Les cellules exposées aux facteurs *Tbx5-Gata4-Baf60c* montrent ainsi des signes de reprogrammation, avec la perte de certains de leurs marqueurs initiaux, tel *Tbx6* et *Mesp1* (Takeuchi et Bruneau 2009). Ceci étant, même si l'on sait que ce complexe fait intervenir une activité de remodelage de la chromatine, via le complexe *Swi/Snf*, des fonctions dans le recrutement de l'activité ARN polymérase II, via le recrutement de facteurs généraux de la transcription, ne sont pas à exclure.

En plus du rôle éventuellement commun aux boîtes T dans le contrôle de l'état épigénétique pendant le développement, des fonctions proprement modulatrices de la transcription, influençant directement l'assemblage de l'appareil transcriptionnel, ont été attribuées à différents membres de la famille. À l'image de *Brachyury*, de nombreux membres de la famille possèdent à la fois des domaines activateurs et répresseurs de la transcription (Kispert et Herrmann 1993; Kispert et al. 1995); c'est le cas de *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*, *Tbx18*, *Tbx20* (Lingbeek et al. 2002). De leur côté, *Tbx4*, *Tbx5*, *Tbx6*, *Tbx19* ont été associés uniquement à une activation de la transcription (Carreira et al. 1998; Habets et al. 2002; Lingbeek et al. 2002; Butz et al. 2004; Zaragoza et al. 2004; Yasuhiko et al. 2006; Farin et al. 2007). Certains cofacteurs ont été décrits pour les différents membres de la famille. Parmi ceux-ci, on sait que *src/p160* est recruté par *Tpit* à ses séquences cibles dans

le promoteur de la proopiomélanocortine (Maira et al. 2003). La protéine rétinoblastome (Rb1) joue un rôle essentiel dans l'activité de Tbx2; l'interaction entre ces deux protéines assure la spécificité d'action de Tbx2 (Vance et al. 2010). Notamment, cette interaction ne peut être compensée, en l'absence de Rb, par les autres membres de la famille, p107 et p130. Plusieurs facteurs de transcription ont aussi été montrés pour interagir avec les facteurs à boîte T, dont des membres de la famille des Gata, des Nkx et des Pitx, avec dans la plupart des démonstrations, une stimulation de l'activité transcriptionnelle (Bruneau et al. 2001; Hiroi et al. 2001; Lamolet et al. 2001).

#### **1.4.2 Activité transcriptionnelle de la sous-famille *Tbx2***

Les membres de la sous-famille *Tbx2* sont répartis en sous-groupes; *Tbx2/Tbx3* et *Tbx4/5*. Dérivés de précurseurs communs, ces gènes ont des patrons d'expression extrêmement conservés, et ce, dans des espèces très divergentes (Fig. 1.6). De tous les paralogues de la famille des boîtes T, *Tbx4* et *Tbx5* sont ceux qui partagent la plus grande homologie de séquence dans leur domaine de liaison à l'ADN (93% d'identité de séquence; Fig. 1.6). Comme mentionné précédemment, les membres de la sous-famille *Tbx2* ont des activités transcriptionnelles différentes; *Tbx3* est un répresseur, *Tbx4* et *Tbx5* se comportent comme des activateurs et *Tbx2* est capable d'assumer les deux fonctions (Paxton et al. 2002).

Les essais transcriptionnels pour mesurer l'activité de ces protéines ont été réalisés à l'aide de fusions avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4, de la levure, pour Tbx2, Tbx3 et Tbx5 (Carlson et al. 2001; Paxton et al. 2002; Zaragoza et al. 2004). Ces activités ont par la suite été validées sur les séquences promotrices des quelques cibles connues pour ces facteurs, dont *p14/ARF* (*p19/ARF* chez la souris), *Anf*, *Connexin43*, *Fgf10* (Jacobs et al. 2000; Lingbeek et al. 2002; Jerome-Majewska et al. 2005; Dobrzycka et al. 2006; Koshiba-Takeuchi et al. 2006; Boogerd et al. 2008). Si des cibles communes ont été décrites pour Tbx5 et Tbx2, il est intéressant de noter que l'activité antagoniste de ces facteurs, Tbx5 en tant qu'activateur et Tbx2 agissant comme répresseur, est importante pour le développement cardiaque, *l'Anf* étant un exemple parfait de ce phénomène. Des études pionnières ont montré que *l'Anf*, un marqueur développemental du myocarde (Christoffels et al. 2000), était activé conjointement par Tbx5 et Nkx2.5 (Lyons et al. 1995; Tanaka et al. 1999a; Tanaka et al. 1999b; Bruneau et al. 2001). De façon intéressante, l'activité transcriptionnelle de Tbx5 sur des cibles comme *Fgf10* et *l'Anf* est régulée dans plusieurs tissus par sa localisation cellulaire qui est influencée par LMP-4 (Krause et al. 2004; Camarata et al. 2006). D'autre part, un aspect important de l'activité de Tbx5 semble reposer sur l'équilibre entre différents isoformes de Tbx5 qui possèdent des activités opposées (Georges et al. 2008). Enfin, le cofacteur Taz, une molécule apparentée à la  $\beta$ -caténine, permet de rehausser l'activité transcriptionnelle de Tbx5 en stimulant l'interaction avec p300 et PCAF pour stimuler l'activation

sur les promoteurs cibles comme *Fgf10* et *Anf* (Murakami et al. 2005). Cette interaction vient ajouter un degré de complexité à la transcription qui dépend de Tbx5 puisque Taz peut agir comme répresseur transcriptionnel dans certains contextes et est aussi la cible de phosphorylations qui modulent sa localisation cellulaire (Basu et al. 2003; Zaidi et al. 2004; Hong et al. 2005).

Il est intéressant de remarquer que les seules données présentes dans la littérature pour Tbx4 font état d'une conservation avec le domaine d'activation de Tbx5 (Zaragoza et al. 2004) ainsi que d'une activité semblable entre Tbx4 et Tbx5 dans l'activation du promoteur proximal de *Fgf10* (Koshiba-Takeuchi et al. 2006). C'est avec ces données en main que le présent travail s'est amorcé. Ce projet s'est développé selon deux facettes; une première visant à déterminer l'implication réelle de *Tbx4* et *Tbx5* dans le processus d'acquisition d'identité lors du développement des membres et la seconde, impliquant la dissection du mécanisme moléculaire sous-tendant cette activité. Ainsi, le premier manuscrit présente les données sur les capacités relatives de Tbx4 et Tbx5 à compenser le phénotype des membres postérieurs déficients en *Pitx1*. Ayant mis en évidence une différence entre ces deux facteurs, nous avons pu la corrélérer avec une divergence d'activité transcriptionnelle. Le troisième chapitre fait ensuite le point sur le détail de l'activité transcriptionnelle de Tbx4 ainsi que sur l'identification de partenaires transcriptionnels. Enfin, le quatrième chapitre est issu d'une collaboration sur l'usage d'un promoteur alternatif dans l'expression de *Pitx3* dans les cellules

musculaires vs celui utilisé dans les neurones dopaminergiques et dans l'œil.

Ce dernier travail a été réalisé en marge du travail principal de la thèse.

## CHAPITRE 2

## **Chapitre 2 : Divergent transcriptional activities determine limb identity**

Jean-François Ouimette, Marisol Lavertu Jolin, Aurore L'honoré, Anthony Gifuni and Jacques Drouin.

Laboratory of Molecular Genetics

Institut de recherches cliniques de Montréal

Montréal QC Canada H2W 1R7

\*Contact information: Jacques Drouin

Laboratoire de Génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110, avenue des Pins Ouest

Montréal Québec H2W 1R7

CANADA



## 2.1 Contribution :

Tel qu'indiqué dans le manuscrit, j'ai directement fait toutes les expériences présentées, avec les précisions suivantes : Marisol Lavertu Jolin a aidé lors de son stage d'été 2007 pour la construction des vecteurs d'expressions Prx1-Tbx4 et Prx1-Tbx5, Aurore L'honoré a aidé à la dissection, la prise de photos et l'analyse des données de longueur et d'angle et Anthony Gifuni, pendant son stage d'été 2006, a introduit la mutation Q538R dans le vecteur d'expression CMV-Tbx4 pour définir l'activité transcriptionnelle de ce mutant (fig 5A). Mon superviseur, Jacques Drouin et moi avons fait le design expérimental, analysé les résultats et écrit le manuscrit en étroite collaboration. Ce travail constitue la fusion entre les données découlant de l'étude fonctionnelle *in vivo* du rôle des Tbx ainsi que celles visant à établir le mécanisme moléculaire de ces protéines.

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans *Nature Communications* le 16 juin 2010 (NCOMMS-09-00227C). Il a été publié en primeur le 13 juillet 2010 dans *Nature Communications*, article #35 p1-9 (doi:10.1038/ncomms1036).

## 2.2 Abstract

Limbs develop using a common genetic program despite widely differing morphologies. This program is modulated by limb-restricted regulators such as the hindlimb (HL) transcription factors Pitx1 and Tbx4 and the forelimb (FL) Tbx5. Both Tbx factors have been implicated in limb patterning and growth but their relative activities and underlying mechanisms remain unclear. We now show that Tbx4 and Tbx5 harbour conserved and divergent transcriptional regulatory domains that account for their roles in limb development. In particular, both factors share an activator domain and the ability to stimulate limb growth. However, we find that Tbx4 is the primary effector of HL identity, for both skeletal and muscle development; this activity relies on a repressor domain that is inactivated by a human *TBX4* small-patella syndrome mutation. We propose that limb identity is largely achieved by default in FL whereas a specific repressor activity unique to Tbx4 determines HL identity.

## 2.3 Introduction

Limbs represent a typical example of serially iterated homologous structures that share a generic programme or *bauplan* for their patterning and growth<sup>1</sup>. A conserved genetic programme that directs limb development has emerged from studies on various species and limb structures<sup>2</sup>. Morphological and functional differences between forelimb (FL) and hindlimb (HL) are presumably achieved through limb-specific modulation of this generic developmental programme. Early embryological experiments indicated that anterior and posterior flank mesenchymes are stably prespecified for FL and HL limb development, respectively<sup>3,4</sup>. The molecular basis for limb-specific development remained elusive until the discovery of limb-restricted transcription factors, such as Pitx1, Tbx4 and Tbx5<sup>5-7</sup>. Pitx1 marks posterior lateral plate mesoderm with an onset soon after gastrulation during mesoderm development (e6.5 – e7.0); this expression is maintained throughout HL development<sup>5</sup>. On the other hand, the FL-restricted Tbx5 and HL-restricted Tbx4 are expressed just before bud outgrowth and their limb-specific expression is maintained in limb mesenchyme throughout embryonic development<sup>6,7</sup>.

Although initial studies of Tbx4 and Tbx5 in chick embryos suggested that these factors contribute to limb identity<sup>8,9</sup>, further investigation in mouse embryos rather supported the view that Tbx4 and Tbx5 have equivalent functions in limbs for control of early limb bud outgrowth, but not for identity<sup>10-14</sup>. Indeed, knockout of the *Tbx5* gene blocked FL bud outgrowth<sup>11</sup> and

temporal control of this inactivation showed a narrow time dependence on *Tbx5* for growth<sup>14</sup>. A similar narrow temporal dependence on *Tbx4* was found for HL bud growth<sup>13</sup>, although complete knockout of *Tbx4* did not prevent HL bud outgrowth as dramatically as for *Tbx5* in FL<sup>10</sup>. Ectopic gain-of-function experiments in FL have further supported the idea that both *Tbx4* and *Tbx5* share growth-promoting activities<sup>12</sup>, an activity that is conserved in a model of an ancestral *Tbx4/5* gene, as found in amphioxus<sup>15</sup>. Oddly, these experiments suggested that mesenchyme expression of *Tbx4* and *Tbx5* does not contribute to cell-autonomous skeletal patterning but that these factors are critical in a non cell-autonomous manner for muscle and tendon patterning<sup>16</sup>. Whereas the relative contributions of *Tbx4* and *Tbx5* to limb identity remain unclear, formal evidence in support of a role of *Pitx1* in specification of HL identity was provided by gene deletion in mice<sup>17,18</sup> and gain-of-function experiments in chicks<sup>19</sup> and mice<sup>12,20</sup>. Most significantly, the *Pitx1* - / - HL lose HL features and develop FL-like skeletal structures<sup>17,18</sup>. In addition to this patterning activity, *Pitx1*, together with the related *Pitx2*, contributes to growth of HLs<sup>21</sup>. These activities are conserved in evolution, as evidenced by genetic studies in sticklebacks<sup>22-24</sup>. Collectively, these studies have supported the role of *Pitx1* as the upstream gene in a regulatory cascade that provides identity during HL development.

As the *Pitx1* mouse mutant HL is deficient in *Tbx4* expression, identity and growth, and given the seemingly contradictory data on the roles of *Tbx4* and *Tbx5* in limb development, we devised an experimental strategy to assess

the properties of each of these transcription factors in HL formation using the *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL model. We now provide evidence that *Tbx4* and *Tbx5* share both the capacity to rescue *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL growth and an activator domain that correlates with this growth-promoting activity. Further, we show that only *Tbx4* can rescue HL skeletal and muscle patterning, thus identifying *Tbx4* as the primary effector of HL identity. This patterning activity is correlated with a transcriptional repressor domain only found in *Tbx4* and that is inactivated by the human small-patella syndrome mutation *TBX4*Q531R. Although *Pitx1* may be considered as the master regulator for specification of HL identity, this study work clearly defines *Tbx4* as the downstream effector functioning on the limb generic programme to determine HL specificity.

## 2.4 Results

### **Tbx4 not Tbx5 rescues Pitx1-dependent HL morphology.**

Because *Pitx1* controls expression of *Tbx4*<sup>17,19</sup>, it has been difficult to assign their respective roles in the HL developmental program. We used the *Pitx1*-deficient HL to define the growth and patterning properties of *Tbx4* and *Tbx5*. We first assessed the reduction of *Tbx4* expression in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL, both at the levels of RNA by wholemount *in situ* hybridization (Fig. 2.1a) and protein by immunohistochemistry (Fig. 2.1b) and Western blot (Fig. 2.1c). The data showed a reduction of *Tbx4* expression of about 4-fold in e11.5 HL buds. We used limb-specific *Prx1-Tbx4* or *Prx1-Tbx5* transgenes (Fig. 2.1d-e) in order to achieve expression levels that are similar to normal HL levels of *Tbx4* as assessed by RT-QPCR (Fig. 2.1f). Thus, the restoration of *Tbx4* expression in *Pitx1*<sup>-/-</sup> mutant HL provided a test of *Tbx4*'s ability to confer HL properties in its normal developmental context.

The *Pitx1*<sup>-/-</sup> mutant hindlimbs lose a number of HL skeletal features, undergo HL to FL-like transformations, gain one FL-like feature and exhibit growth defects. We observed overall *Tbx4* rescue of HL skeletal features that are dependent on *Pitx1*, such as pelvic girdle and general HL morphology (Fig. 2.2, column 3 compared to 1, 2). *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimbs do not develop the ilium and this result in anterior displacement of the limbs: both defects were rescued by *Tbx4* (Fig. 2.2a-c). Another hallmark of HLs is the rotation of the limbs from a lateral to ventro-medial position: this rotation is not observed in absence of

*Pitx1* and it was rescued by *Tbx4* (Fig. 2.2a). Bone contacts of *Pitx1*<sup>-/-</sup> knee joints represent the most striking HL to FL-like transformation<sup>17,18</sup>. In *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL, the fibula switches contacts from tibia to femur (Fig. 2.2d-e, column 2) similar to the FL joint. Proper knee contacts were re-established in the *Tbx4*-rescued HL and the head of the fibula appeared to be “repulsed” away from the femur (Fig. 2.2d-e, column 4). At the distal joint, *Tbx4* expression restored the normal angle of the calcaneus relative to footplate in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL (Fig. 2.2f). Finally, the HL program also appears to include suppression of one FL feature, namely the deltoid tuberosity of the humerus (Fig. 2.2g, column 5) for which there is no HL counterpart. A similar tuberosity is observed on *Pitx1*<sup>-/-</sup> femurs (Fig. 2.2g, column 2) and it was always suppressed in *Tbx4*-rescued HL (Fig. 2.2g, column 3). Interestingly, two HL features lost in *Pitx1*<sup>-/-</sup> embryos, namely the patella and small fibula/tibia width ratio, were not rescued by *Tbx4* (Fig. 2.2a, d, and Table 1). The simplest interpretation is that these features require either *Pitx1* itself or another *Pitx1* target gene different from *Tbx4*. In summary, *Tbx4* rescued the bulk of skeletal defects associated with the *Pitx1*<sup>-/-</sup> loss of HL identity (Table 2.1).

In contrast, the *Tbx5* transgene was unable to rescue the *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL patterning defects (Fig. 2.2c-g, column 4 and Table 1) despite being expressed at similar levels compared to the *Tbx4* transgene (Fig. 2.1f). However, introduction of *Tbx5* in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL produced one novel skeletal transformation that is reminiscent of a FL-specific feature: indeed, the angle of the pelvic girdle relative to spine in the *Tbx5* transgenics is greater (by  $27^{\circ} \pm 5^{\circ}$ )

than normal, *Pitx1*<sup>-/-</sup> and *Tbx4*-rescued pelvic girdles (Fig. 2.2b, column 4 vs 1, 2, 3) and reminiscent of the scapula/spine angle (Fig. 2.2b, column 5). However, *Tbx5*'s ability to direct appearance of FL features in HL may be limited by the assay since it relies on expression at an ectopic site. These data unambiguously highlight the unique HL determination properties of *Tbx4* and suggest limited FL-determination activity for *Tbx5* (Table 2.1).

### ***Tbx4* but not *Tbx5* rescues HL muscle patterning**

Both *Pitx1*<sup>20</sup> and *Tbx4/Tbx5*<sup>16</sup> have been suggested to contribute to muscle and tendon patterning. We assessed muscle patterning in e14.5 *Pitx1*<sup>-/-</sup> mutant HL using wholemount in situ immunohistochemistry against myosin heavy chain (Fig. 2.3). A characteristic feature of HL zeugopod anterior muscles is their attachment to skeletal elements at or below the knee joint (Fig. 2.3a,g). In *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL, these muscles are displaced proximally (Fig. 2.3b) such that they now reach the level of stylopod muscles (Fig. 2.3b,h). *Tbx4* fully rescued the position of these muscles (Fig. 2.3c,i) but not *Tbx5* (Fig. 2.3d,j). These muscles take part in control of movement by autopod skeletal elements; in HL, this control is thus independent of stylopod structures (except for the EDL, Fig. 2.3e). This is in sharp contrast to FL where equivalent muscles reach from stylopod to autopod, thus providing finer coordination of autopod movements (Fig. 2.3f). The proximal shift of these muscles observed in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL therefore represents a transformation that renders muscle patterning



more similar to a FL pattern<sup>25</sup> (Fig. 2.3f). Ectopic expression of *Pitx1* in FL<sup>20</sup> was shown to change the split extensor carpi radialis (ECR) muscles into a single muscle akin to the HL tibialis anterior (TA, Fig. 2.3e,f). In agreement with these observations, the *Pitx1*<sup>-/-</sup> TA is split into two muscles (Fig. 2.3b) similar to the FL ECR, and *Tbx4* expression restored normal TA morphology (Fig. 2.3c,i). Another striking transformation is observed for the extensor digitorum brevis (EDB) that normally links the calcaneus to phalanges within the autopod (Fig. 2.3a,e); in FL, the corresponding muscle<sup>26</sup>, the extensor indicis propius (EIP), reaches out of the autopod to attach to the ulna (Fig. 2.3f). Interestingly, the EDB appears to be displaced proximally from the autopod to the zeugopod in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL (Fig. 2.3b) and this is rescued by *Tbx4* (Fig. 2.3c). It is noteworthy that ectopic overexpression of *Pitx1* in FL led to a reciprocal transformation, i.e. a distal shift of the EIP<sup>20</sup>. Collectively, the data support the role of *Tbx4* in HL-specific patterning of both skeleton and muscles (Table 2.1).

### **Growth properties shared by Tbx4 and Tbx5.**

*Tbx4* and *Tbx5* have been implicated in regulation of early limb bud growth and bone length<sup>11-13,29</sup>. We thus assessed *Tbx4* and *Tbx5*'s ability to restore skeletal growth defects in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL. *Tbx4* rescued femur length in *Pitx1*-deficient HL and *Tbx5* was almost as effective (Fig. 2.2g, columns 3 and 4 vs 2). Interestingly, both *Tbx* factors rescued the left-right asymmetry in femur length<sup>21</sup> observed in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL (Fig. 2.4a). Another bone length defect

is reflected by the HL fibula/tibia length ratio. This ratio reflects both altered growth and patterning difference at the HL compared to FL stylopod/zeugopod junction. This ratio is increased in *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL and becomes similar to the length ratio of FL ulna/radius (Fig. 2.4b). *Tbx4* and *Tbx5* transgenes decreased this ratio significantly, although less so for *Tbx5* and not reaching the wild-type HL ratio (Fig. 2.4b). These data confirm the shared growth-promoting activity of *Tbx4* and *Tbx5*, in agreement with prior gain-of-function experiments in FL buds<sup>12</sup>. Indeed, while *Tbx4* can substitute for *Tbx5* to support FL development<sup>12</sup>, *Tbx5* is not equivalent to *Tbx4* to dictate the HL program (Table 2.1). Collectively, these data suggest that the generic or default limb development program depends on shared activities of *Tbx4* and *Tbx5* and the present data clearly defined *Tbx4*-dependent HL-specific skeletal patterning mechanisms.

#### **Molecular mechanism underlying HL-specific activity of *Tbx4*.**

To investigate the molecular basis of shared and unique activities of *Tbx4* and *Tbx5*, we assessed their transcriptional properties in cells transfected with luciferase reporters containing either monomer or dimer of T-box binding elements (TBE). As previously reported, *Tbx5* behaved as a transcriptional activator<sup>30</sup> whereas *Tbx4* repressed these reporters (Fig. 2.5a). Both activator and repressor activities were mapped to the C-terminal domains using Gal4DBD chimeras (Fig. 2.5b,d). Deletion mapping located the *Tbx5*

activator domain to its distal C-terminus (Fig. 2.5b, green box) in agreement with previous reports<sup>30</sup>. In contrast, the Tbx4 C-terminus contains a repressor domain (Fig. 2.5b, magenta box in construct 6) but its deletion resulted in unmasking of an activator domain that was lost upon further deletion (Fig. 2.5b, green box in construct 7). These data suggest that Tbx4 is unique by having a repressor domain not shared with Tbx5. It also contains an activator domain that exhibits 49% sequence conservation compared with Tbx5 (Supplementary Fig. 2.1a,b). It is thus reasonable to propose that the HL-specific activities of Tbx4 may correlate with its repressor activity whereas the growth stimulatory activities shared with Tbx5 may be ascribed to the conserved activator domain.

The Tbx4 HL patterning activity revealed in the present work sharply contrasts the lack of any such activity in previous studies where Tbx4 was overexpressed in FL<sup>12</sup>. A simple explanation for this discrepancy might be that the FL and HL mesenchymes have different properties in agreement with cell aggregation experiments<sup>31</sup>. For example, the presence of a HL-specific transcriptional co-repressor acting with Tbx4 could fully support this model, as was documented in other systems<sup>32,33</sup>. We directly assessed the transcriptional properties of full-length Tbx4 in primary cultures derived from mouse e11.5 HL and FL buds (Fig. 2.5c). These experiments clearly showed the ability of HL-derived cells to support the repressor activity of Tbx4. In striking contrast, Tbx4 did not exhibit any repressor activity in FL-derived cells, but rather behaved as a transcriptional activator (Fig. 2.5c). These data

reconcile our observations with the ectopic gain-of-function experiments performed by overexpression in FL: clearly, FL-derived mesenchyme cannot support the relevant Tbx4 HL specifying activity.

### **Tbx4 repressor activity correlates with HL patterning.**

It is noteworthy that dominant human mutations of *TBX4* cause small-patella-syndrome, a congenital malformation affecting hindlimbs<sup>34</sup>. The *TBX4Q531R* (mouse *Tbx4Q538R*) small-patella mutation maps within the Tbx4 repressor domain (Fig. 2.5b) and we observed that this mutant protein lost repressor but retained activator functions (Fig. 2.5a). Consistent with the loss of repressor activity, Tbx4Q538R failed to rescue HL-specific features, including formation of the ilium and anterior HL displacement, knee joint and calcaneus structure (Fig. 2.5e-g), and also failed to suppress the ectopic femoral tuberosity (Fig. 2.5f). In contrast, Tbx4Q538R is as efficient as Tbx4 and Tbx5 for rescue of femur length (Fig. 2.5f and Fig. 2.2g). Finally, this mutant did not change the angle between pelvic girdle and spine and is thus devoid of this Tbx5-specific FL property (Fig. 2.5g). In summary, the Tbx4Q538R mutant is only deficient in its ability to direct HL-specific features while retaining the shared Tbx4/5 property to stimulate growth (Table 2.1), clearly implicating the Tbx4 repressor activity in determination of hindlimb identity.

**Ancestral Tbx4/5 is devoid of repressor activity.**

A recent report indicated that the amphioxus *Tbx4/5* ancestral gene shares FL growth stimulatory properties with *Tbx4* and *Tbx5*<sup>15</sup>. It was thus interesting to test whether conservation of growth activity is correlated with transcriptional activation. The full-length amphiTbx4/5 exhibited activator properties similar to Tbx5 (Fig. 2.5a) and this activity was mapped to amphiTbx4/5 C-terminus (Fig. 2.5d). Further, sequence comparisons suggest significant amino acid conservation within the amphioxus region homologous to the mouse activator domains (37% compared to 25% for entire C-terminus, Supplementary Fig. 2.1c,d). These data are consistent with a model in which the growth stimulatory and activator properties of Tbx4/5 are more evolutionarily ancient compared to the repressor activity of Tbx4 that correlates with HL specificity.

## 2.5 Discussion

Contrary to the current view, the present work shows that *Pitx1*-dependent *Tbx4* is the primary effector of HL identity. This conclusion is supported for both skeletal and muscle patterning (Table 2.1). This property is not shared by *Tbx5*, although both transcription factors share growth-promoting activities as previously reported<sup>12</sup>. Molecular dissection of *Tbx4* and *Tbx5* defined conserved transcriptional activation domains (Fig. 2.6a) that are correlated with their shared growth-promoting activity (Fig. 2.6b). The conservation of this activity and of the growth-promoting activity in the evolutionary distant amphioxus *Tbx4/5* supports this model<sup>15</sup>. Significantly, previous gain-of-function paradigms used to investigate *Tbx4* and *Tbx5* only revealed this shared activity<sup>12</sup>. It appears that the HL-specific cell context is required to elicit the *Tbx4* repressor activity that is correlated with its HL-specifying activities. The *Tbx4* repressor domain mapped in the present work and inactivated by a human small-patella syndrome *TBX4* mutation thus provide a molecular basis for HL specificity (Fig. 2.6b). The difficulty of revealing this *Tbx4* activity in mouse FL gain-of-function experiments<sup>12,20</sup> may be due to the requirement for a HL-restricted co-repressor (Fig. 2.6b); expression of this co-repressor (or a related one) may not be as restricted in chick where *Tbx4* appeared sufficient to convey HL features to FL<sup>9</sup>. Further, the need for *Pitx1* together with *Tbx4* to alter mouse FL identity<sup>12</sup> may also be explained by *Pitx1*-dependent expression of this putative co-repressor (Fig. 2.6b).

The involvement of two key regulatory transcription factors, *Pitx1* and *Tbx4*, in specification of HL identity (in contrast to the relatively minor role of *Tbx5* in FL) provides molecular support to the idea that HL represent a novel plan compared to FL or a default *bauplan* (Fig. 2.6). The shared growth-promoting activity of *Tbx4* and *Tbx5* is a likely critical component of this *bauplan*<sup>11,35</sup>. The repressor activity/domain of *Tbx4* may thus be an evolutionary novelty. The gain of this *Tbx4* repressor domain (Fig. 2.6a) may have led to the appearance of HL specificity although it cannot be formally excluded that this feature was rather lost in evolution of *Tbx5* and FL program. Be that as it may, the *Tbx4* repressor domain clearly provides a molecular basis for determination of HL identity (Fig. 2.6b). Posterior mesoderm expression of *Pitx1* and of the downstream *Tbx4* thus results in HL-specific modulation of the generic limb program.

It was suggested and recently shown that changes in *Pitx1* regulatory sequences are responsible for pelvic fin reductions in sticklebacks<sup>22,24</sup> and for loss of HL in manatees<sup>36</sup>. Although the gain of *Pitx1* regulatory control is critical for specification of HL identity, the acquisition of a *Tbx4* repressor domain/activity is also essential for execution of a HL-specific program. It is thus likely that changes in both coding and regulatory sequences were needed for evolution of the posterior limbs.

## 2.6 Methods

### Mouse lines, embryos and skeletal preparations

The *Pitx1*<sup>-/-</sup> mice were described previously<sup>17</sup>. *Prx1-Tbx4*, *Prx1-Tbx4Q538R* and *Prx1-Tbx5* transgenes were constructed using the *Prx1* promoter (2.4 kb from -1748 to +572 bp, graciously provided by Dr. J.F. Martin) described in<sup>37</sup> to drive expression of mouse *Tbx4*, *Tbx4Q538R* or *Tbx5* full-length cDNAs followed by SV40 polyadenylation sequences. Genotyping of embryos was carried out by PCR as described<sup>17</sup> using DNA isolated from the umbilical cord/amniotic membrane and a forward primer in the *Prx1* enhancer (CCAAAGGGGCTCTCTCCTTA) with a reverse primer either in *Tbx4/Tbx4Q538R* (CCCACCTTGATGTTCTCGAT) or in *Tbx5* (GACCTGTCTTGGAAATCAGG) cDNAs. All mice used in this study were in mixed genetic background. Noon of the day on which a vaginal plug was detected was staged as e0.5. *Tbx4/Tbx4Q538R* or *Tbx5* expressing *Pitx1*<sup>-/-</sup> embryos (*Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Prx1-Tbx4*, *Prx1-Tbx5* or *Prx1-Tbx4Q538R*) were obtained by crossing *Pitx1*<sup>+/-</sup>;*Prx1-Tbx4*, *-Tbx4Q538R* or *Tbx5* males with *Pitx1*<sup>+/-</sup> females. For skeletal preparation, embryos staged as e17.5 were processed using a standard Alcian Blue and Alizarin Red staining procedure<sup>21</sup>. All animal procedures were approved and conducted in accordance with IRCM Animal Ethics Review Committee regulations.



### **Bone length and angle measurements**

Limb bone length and calcaneus angle measurements were determined using the Northern Eclipse software, by averaging the indicated number of independent measurements, on three different pictures of skeletal preparations laid on an agarose bed, taken so that the analyzed bone sits in plane. Femur/humerus lengths were measured from head to the most distal point of medial epicondyle. Tibia and fibula lengths were measured from their apex to the most distal malleolus extremity. Ulna and radius were measured from the styloid process to the olecranon or head, respectively. Pictures were taken on a dissecting scope (Leica MZ12) using a camera obtained from QImaging (Micropublisher 3.3 RTV).

### **Statistical analyses**

Ratio of fibula/tibia bone length were compared using two-tailed Student's t-test.

### **Wholemout *In Situ* Hybridization and Immunocytochemistry**

Wholemout *in situ* hybridization and immunocytochemistry were performed as described<sup>21</sup>. Affinity-purified Tbx4 rabbit polyclonal antibodies raised against the MBP protein fused to amino acids 327-390 of mTbx4 were used for Tbx4 immunohistochemistry. Wholemount immunodetection<sup>38</sup> of myosin

heavy chain (MHC) were performed on e14.5 embryos. Briefly, embryos were bleached in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, blocked in PBSMT (0.0038 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.0162 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.150 M NaCl, 2% milk, 2.5% Triton X-100, pH 7.4) and incubated with the monoclonal alkaline phosphatase conjugated anti-myosin heavy chain (MHC) diluted 1/100 in PBSMT (MY32 clone; A4335, Sigma). After numerous washes in PBSMT first and then in NTMT (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris pH 9.5, 0.050 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20), alkaline phosphatase activity was revealed in NTMT using Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate (NBT/BCIP) substrate (Roche). MHC-stained HL muscles were identified by comparison<sup>28,39</sup> to data deposited at <http://www.nimr.mrc.ac.uk/3dlimb/> using J Atlas View and generated by Optical Projection Tomography (OPT)<sup>25,26</sup>.

### **Branchiostoma floridae (amphioxus) Tbx4/5 cDNA cloning**

*AmphiTbx4/5* was cloned from 48 h embryonic cDNA (gift of Vincent Laudet and Hector Escriva, Lyon, France) by PCR using fwd primer ATGTCTGGGGATTTGAAGGA and reverse primer TTATTGTGGAATTTGCATGG (from accession no. EU084005).

### **Transfections**

CV-1 cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method. Cells (40,000) were plated in 12-well-plates. A total of 3 µg DNA (1.5 µg reporter plasmid, 0-0.75 µg effector plasmid or empty expression vector, 25

ng of CMV- $\beta$ -galactosidase as internal control and 0-0.75  $\mu$ g carrier pSP64 DNA) was used for each transfection, performed in duplicates. TBE-Luc and 5xUAS-Luc reporter plasmids were used<sup>40,41</sup>. Limb bud derived cells were isolated from e11.5 CD1 mouse embryos by collagenase treatment (0.1%; Worthington), plated in 12-well plates (50,000 per well) and transfected using the Effectene reagent (QIAGEN). 0.3  $\mu$ g of DNA (100ng reporter plasmid, 0-100 ng effector plasmid, 20 ng of CMV- $\beta$ -galactosidase and 80 ng of pSP64 DNA) was transfected with 6  $\mu$ l of Effectene reagent and 2.4  $\mu$ l Enhancer, according to manufacturer recommendations. Sixteen hours after transfection, media were changed and cells harvested 24 h later, using lysis buffer [0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM dithiothreitol (DTT)]. Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were assayed in lysates with a luminometer using the luciferin substrate (Gold biotechnology) or the Galacto-Light system (TROPIX)<sup>42</sup>

### **Expression Analysis**

Transgene expression was measured in dissected e11.5 hindlimb buds that were frozen before RNA extraction using RNeasy mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen). cDNA synthesis was performed using SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT on 25 ng of total RNA. Quantitative real time PCR (MX-3005; Stratagene, La Jolla, CA) was performed with cDNA and the SYBR Green kit (Qiagen). The following

primers were used: Tbx4fwd (5'-ACAACAAATGGATGGTCGCAGG-3') with Tbx4rev (5'-TTCTCGTCGGCCTTAACGATGT-3') and Tbx5fwd (5'-GTACCAGTGTGAGAATGGTGTC-3') with Tbx5rev (5'-CGACTCTGTCCTGTAAGAGGTA-3'). *Tbx5* expression was never detected in *Pitx1*<sup>+/+</sup> or *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL. Relative expression was calculated relative to a control sequence within the *GAPDH* gene [primer GAPDHfwd (5'-TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT-3') with GAPDHrev (5'-ACTGTGCCGTTGAATTTGCC-3')]; its expression is unaltered in *Pitx1*<sup>-/-</sup> e11.5 hindlimb buds.

### **Western Blot**

Hindlimb buds were dissected at e11.5 and kept at -80°C during the genotyping procedure. Protein extracts were obtained by homogenization in lysis buffer (25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 20 mM HEPES pH 7.9 and 5 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM DTT). Homogenates were submitted to 3 cycles of dry-ice freezing / thawing. Protein concentration was determined with Protein Assay Reagent Concentrate reagent (Bio-Rad) and 50 µg samples were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. Blotting was first performed with the Tbx4 antibody; after stripping (100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7 for 30 min at 50°C), membranes were blotted with the alpha-tubulin antibody (Santa Cruz, sc-

32293). Protein amounts were quantitated using ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics).

## 2.7 References

1. Weatherbee, S. D. & Carroll, S. B. Selector genes and limb identity in arthropods and vertebrates. *Cell* **97**, 283-286 (1999).
2. Zeller, R., Lopez-Rios, J. & Zuniga, A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 845-858 (2009).
3. Zwilling, E. Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud. *J. Exp. Zool.* **128**, 423-441 (1955).
4. Zwilling, E. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo i. axis establishment. *J. Exp. Zool.* **132**, 157-172 (1956).
5. Lanctôt, C., Lamolet, B. & Drouin, J. The *bicoid*-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124**, 2807-2817 (1997).
6. Chapman, D. L. *et al.* Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev. Dyn.* **206**, 379-390 (1996).
7. Gibson-Brown, J. J. *et al.* 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 (1996).
8. Rodriguez-Esteban, C. *et al.* The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-818 (1999).

9. Takeuchi, J. K. *et al.* Tbx5 and Tbx4 genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* **398**, 810-814 (1999).
10. Naiche, L. A. & Papaioannou, V. E. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* **130**, 2681-2693 (2003).
11. Rallis, C. *et al.* Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth. *Development* **130**, 2741-2751 (2003).
12. Minguillon, C., Del Buono, J. & Logan, M. P. Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev. Cell* **8**, 75-84 (2005).
13. Naiche, L. A. & Papaioannou, V. E. Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth. *Development* **134**, 93-103 (2007).
14. Hasson, P., Del Buono, J. & Logan, M. P. Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth. *Development* **134**, 85-92 (2007).
15. Minguillon, C., Gibson-Brown, J. J. & Logan, M. P. Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 21726-21730 (2009).
16. Hasson, P. *et al.* Tbx4 and Tbx5 acting in connective tissue are required for limb muscle and tendon patterning. *Dev. Cell* **18**, 148-156 (2010).

17. Lanctôt, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M. L. & Drouin, J. Hindlimb patterning and mandible development require the *Ptx1* gene. *Development* **126**, 1805-1810 (1999).
18. Szeto, D. P. *et al.* Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev.* **13**, 484-494 (1999).
19. Logan, M. & Tabin, C. J. Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity. *Science* **283**, 1736-1739 (1999).
20. DeLaurier, A., Schweitzer, R. & Logan, M. Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb. *Dev. Biol.* **299**, 22-34 (2006).
21. Marcil, A., Dumontier, É., Chamberland, M., Camper, S. A. & Drouin, J. *Pitx1* and *Pitx2* are required for development of hindlimb buds. *Development* **130**, 45-55 (2003).
22. Shapiro, M. D. *et al.* Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* **428**, 717-723 (2004).
23. Cole, N. J., Tanaka, M., Prescott, A. & Tickle, C. Expression of limb initiation genes and clues to the morphological diversification of threespine stickleback. *Curr. Biol.* **13**, R951-R952 (2003).
24. Chan, Y. F. *et al.* Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer. *Science* **327**, 302-305 (2010).



25. DeLaurier, A. *et al.* The Mouse Limb Anatomy Atlas: an interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning. *BMC Dev. Biol.* **8**, 83 (2008).
26. Feng, G. *et al.* J Atlas View: a Java atlas-viewer for browsing biomedical 3D images and atlases. *BMC Bioinformatics* **47** (2005).
27. Greene, E.C. Anatomy of the rat. Hafner Publishing Company, New York and London (1963).
28. Humphry, G.M. Observations in myology. McMillan and Co., Cambridge and London (1872).
29. Menke, D. B., Guenther, C. & Kingsley, D. M. Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs. *Development* **135**, 2543-2553 (2008).
30. Zaragoza, M. V. *et al.* Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal. *Gene* **330**, 9-18 (2004).
31. Downie, S. A. & Newman, S. A. Morphogenetic differences between fore and hind limb precartilaginous mesenchyme: relation to mechanisms of skeletal pattern formation. *Dev. Biol.* **162**, 195-208 (1994).
32. Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* **27**, 728-735 (2006).

33. Strubin, M., Newell, J. W. & Matthias, P. OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell* **80**, 497-506 (1995).
34. Bongers, E. M. *et al.* Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 1239-1248 (2004).
35. Takeuchi, J. K. *et al.* Tbx5 and Tbx4 trigger limb initiation through activation of the Wnt/Fgf signaling cascade. *Development* **130**, 2729-2739 (2003).
36. Shapiro, M. D., Bell, M. A. & Kingsley, D. M. Parallel genetic origins of pelvic reduction in vertebrates. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 13753-13758 (2006).
37. Martin, J. F. & Olson, E. N. Identification of a prx1 limb enhancer. *Genesis* **26**, 225-229 (2000).
38. Gregoire, D. & Kmita, M. Recombination between inverted loxP sites is cytotoxic for proliferating cells and provides a simple tool for conditional cell ablation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 14492-14496 (2008).
39. Huxley, T. H. Hunterian Lectures on The Structure and Classification of the Mammalia. *Medical Times and Gazette* 203-204 (1864).
40. Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E. N. & Nakagawa, O. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor

implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 18034-18039 (2005).

41. Puigserver, P. *et al.* Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* **286**, 1368-1371 (1999).

42. Coulon, V. *et al.* A muscle-specific promoter directs *Pitx3* gene expression in early muscle cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 33192-33200 (2007).

## **2.8 Footnotes**

### **Acknowledgements**

We are extremely grateful to Vincent Laudet, Hector Escriva and Juliette Rambaud who provided the amphioxus cDNA. We are indebted to Marie Kmita, Michel Cayouette, Arthur Kania and Marko Horb for suggestions and critical reading of this manuscript. We thank Michel Robillard and Qinzhang Zhu for transgenic mice production, and Lise Laroche for secretarial assistance. The work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J. D.

### **Author contributions**

J.F.O. and M.L.J. constructed the transgenes; J.F.O. and A.L. processed the embryos and collected the data on the embryos; J.F.O. and A.G performed transfection assays; J.F.O. and J.D. designed the study, analysed the data and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

### **Additional information**

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Reprints and permissions** information is available at

[www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Correspondence and requests** for materials should be addressed to J.D.

**Competing financial interest.** The authors declare no competing financial interests.

## 2.9 Figure Legends

### Figure 2.1. Rescue of *Tbx4* expression in *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb buds.

(a) *In situ* hybridization showing *Tbx4* mRNA expression in wild-type (*Pitx1*<sup>+/+</sup>) and *Pitx1*<sup>-/-</sup> e10.5 hindlimb (HL) buds. Bar represents 500  $\mu$ m. (b) Immunohistochemical detection of nuclear *Tbx4* protein in transverse sections of e11.5 embryos of wild-type and *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL buds and flank mesenchyme (fm). Bar represents 100  $\mu$ m. (c) Western blot analysis of *Tbx4* and alpha-tubulin levels in *Pitx1*<sup>+/+</sup>, *Pitx1*<sup>+/-</sup> and *Pitx1*<sup>-/-</sup> e11.5 HL buds. Normalized *Tbx4* levels are shown relative to alpha-tubulin levels (n=3). (d) Schematic representation of transgenes used in present work. Transgenic activity of the *Prx1* promoter was described previously<sup>37</sup>. (e) Wholemount *in situ* hybridization analysis of transgene expression in e11.5 embryos. Bar represents 500  $\mu$ m. (f) Quantitation of *Tbx4*, *Tbx5* or *Tbx4Q538R* expression levels by RT-QPCR performed on RNA extracted from dissected e11.5 HL buds expressed relative to *Gapdh* mRNA. Error bars indicate s.e.m. (n=3).

### Figure 2.2. Rescue of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb (HL) skeletal defects by *Tbx4*, but not *Tbx5*.

(a) Lateral view of e17.5 skeletal preparations (Alcian Blue/Alizarin Red staining of cartilage and bone, respectively) showing lower spine and hindlimbs of *Pitx1*<sup>+/-</sup> (identical to *Pitx1*<sup>+/+</sup>), *Pitx1*<sup>-/-</sup> and transgene rescues. (b) Angle of pelvis (dotted outline) relative to spine. The increased angle observed

in *Tbx5* transgenics (column 4) was quantitated ( $\pm$  s.e.m.) for embryos showing displacement (n=5/5). Forelimb (FL) scapula (dotted line) relative to spine angle in column 5. **(c)** Loss of ilium (il) in *Pitx1*<sup>-/-</sup> (column 2) embryos and anterior HL displacement with femur head aligned (dotted line) with sacral vertebra S1 rather than S3 (column 1). Complete rescue of ilium and HL position in 8/10 (partial in 2) *Tbx4* transgenic mice (column 3), not in *Tbx5* transgenics (n=5/5). Is, ischium. **(d)** Limb joints for indicated limb and genotype. **(e)** Schematic of bone contacts, with green line between fibula (Fb)/tibia (Ti) in *Pitx1*<sup>+/-</sup> and *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Prx1-Tbx4* HL and magenta between ulna (Ul)/humerus (Hum) in FL or mutant fibula/femur (Fe) in *Pitx1*<sup>-/-</sup> mutant and *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Prx1-Tbx5* HL. Rescue of normal HL contacts in 5/10 *Tbx4* transgenic skeletons examined (column 3) but not *Tbx5* (n=5/5). **(f)** Angle (black line) between calcaneus and footplate in HL or between pisiform and handplate in FL. Angle ( $\pm$  s.e.m.) measured for the number (n) of rescued embryos as indicated. **(g)** Femur length ( $\pm$  s.e.m.) for indicated genotypes and number (n) of embryos examined. *Pitx1*<sup>-/-</sup> femurs develop a tuberosity (asterisk, columns 2 and 4,) that is similar to humerus deltoid tuberosity (DT, column 5). Bars represent 1 mm in a, b, c, f, g and 0.2 mm in d.

**Figure 2.3. *Tbx4* rescues muscle patterning of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimbs.**

Front **(a-d)** and lateral **(g-j)** views of hindlimbs from e14.5 embryos stained by wholemount immunohistochemistry for myosin heavy chain. The lower leg (zeugopod) muscles **(a,g)** of *Pitx1*<sup>+/+</sup>, **(b,h)** *Pitx1*<sup>-/-</sup>, **(c,i)** *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Prx1-Tbx4*

and **(d,j)** *Pitx1*<sup>-/-</sup>;*Prx1-Tbx5* HL are highlighted and color-coded in the drawings. Lighter colors in b, d, h, j reflect muscle assignment by analogy in mutants with altered patterning. **(e,f)** Optical projection tomography (OPT) of wild-type e14.5 (e) HL and (f) FL muscles are depicted with color-coded identification. In lower part below dotted line, the EDL or EDL+C were removed in order to visualise the underlying EDB or EIP. **(k,l)** Lateral OPT views of HL and FL. Dotted arrows indicate TA **(e)** and ECR **(f)** while full arrows point to EDB (in HL, **e**) and EIP (in FL, **f**). Analogy between HL and FL muscles is based on comparative studies<sup>28,39</sup>. OPT pictures were generated using JAtlasView (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/3dlimb/>)<sup>25,26</sup>. Bars represent 0.5 mm.

**Figure 2.4. Rescue of *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL bone growth by *Tbx4* and *Tbx5* expression.**

**(a)** Length ( $\pm$  s.e.m., n=5-10) of left (L) and right (R) femurs for skeletons of indicated genotypes. All lengths are statistically different ( $p < 0.01$ ) when compared to *Pitx1*<sup>-/-</sup> femurs. **(b)** Ratio of zeugopod bone lengths in limbs of indicated genotypes. \*\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , NS, not significant. Error bars indicate s.e.m. (n=5-10).



**Figure 2.5. Hindlimb-specific functions of Tbx4 correlate with repressor activity that is lost in human small-patella mutation *TBX4Q531R*.**

**(a)** Transcriptional activities of mouse Tbx5, Tbx4, Tbx4Q538R and amphioxus Tbx4/5 in CV-1 cells assessed with reporter containing Tbox binding regulatory element (TBE) in either one or two copies (2xTBE). Error bars indicate s.e.m. (n=5). Data are statistically ( $p < 0.01$ ) different from control.

**(b)** Deletion analysis of Tbx4/Tbx5 C-terminal domains using Gal4 DBD fusions. Deletion end-points are indicated on diagrams. Green box indicates activator domain whereas magenta box represents repressor domain. Error bars indicate s.e.m. (n=5). \* $p < 0.01$  compared to control.

**(c)** Tbx4 is a transcription activator in e11.5 FL primary cells and a repressor in HL primary cells. The activity of full-length Tbx4 fused to Gal4DBD was assessed by transfection in primary cells of indicated limb buds. Data are represented as means  $\pm$  s.e.m. (n=3). \* $p < 0.01$  compared to control.

**(d)** Full-length amphioxus Tbx4/5, and its C-terminus, have activator properties in CV-1 cells transfected as in b above. Error bars indicate s.e.m. (n=3). \* $p < 0.01$  compared to control.

**(e-g)** *Tbx4Q538R* transgene is unable to rescue **(e)** ilium development and HL anterior displacement (dotted line), **(f)** to suppress ectopic tuberosity (asterisk) or **(g)** to change pelvic angle but rescues femur length ( $\pm$  s.e.m., n=3). Alizarin Red and Alcian Blue staining as in Figure 2.

**Figure 2.6. Transcriptional basis for evolution of Tbx4/5 roles in limb development.**

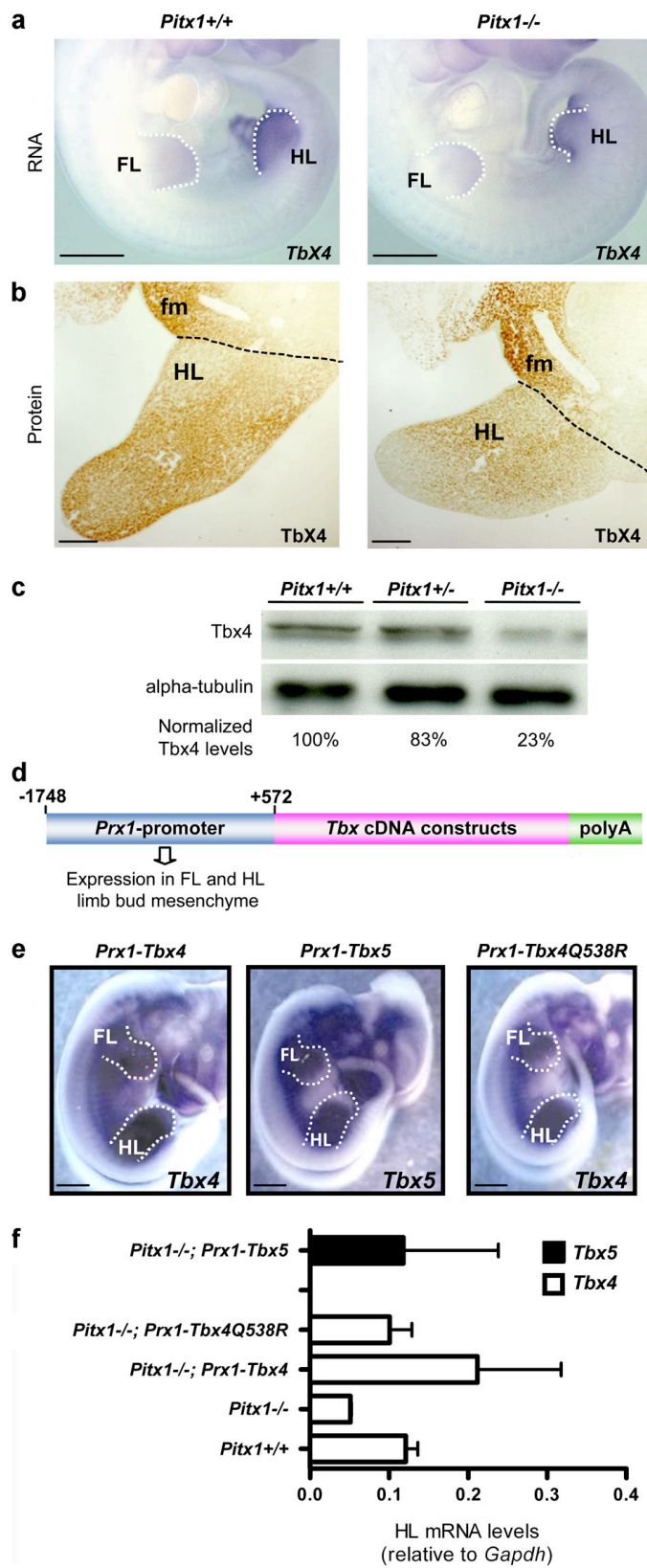
(a) Schematic representation for divergence of an ancestral Tbx4/5 transcription factor that had activator domain (green) and for gain of repressor domain (magenta) in Tbx4. The small-patella-syndrome *Tbx4* mutation Q538R is within this domain. (b) The shared activator domain (green) is proposed to act on limb bud growth whereas the Tbx4 repressor domain (magenta) determines hindlimb identity. Expression of *Tbx4* in hindlimbs is enhanced by *Pitx1*; similarly, expression of a putative co-repressor (CoR) required for Tbx4 repressor activity may be regulated by *Pitx1*.

**Table 2.1. Summary of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb defects and rescue by *Tbx4*, *Tbx5* and *Tbx4Q538R*.**

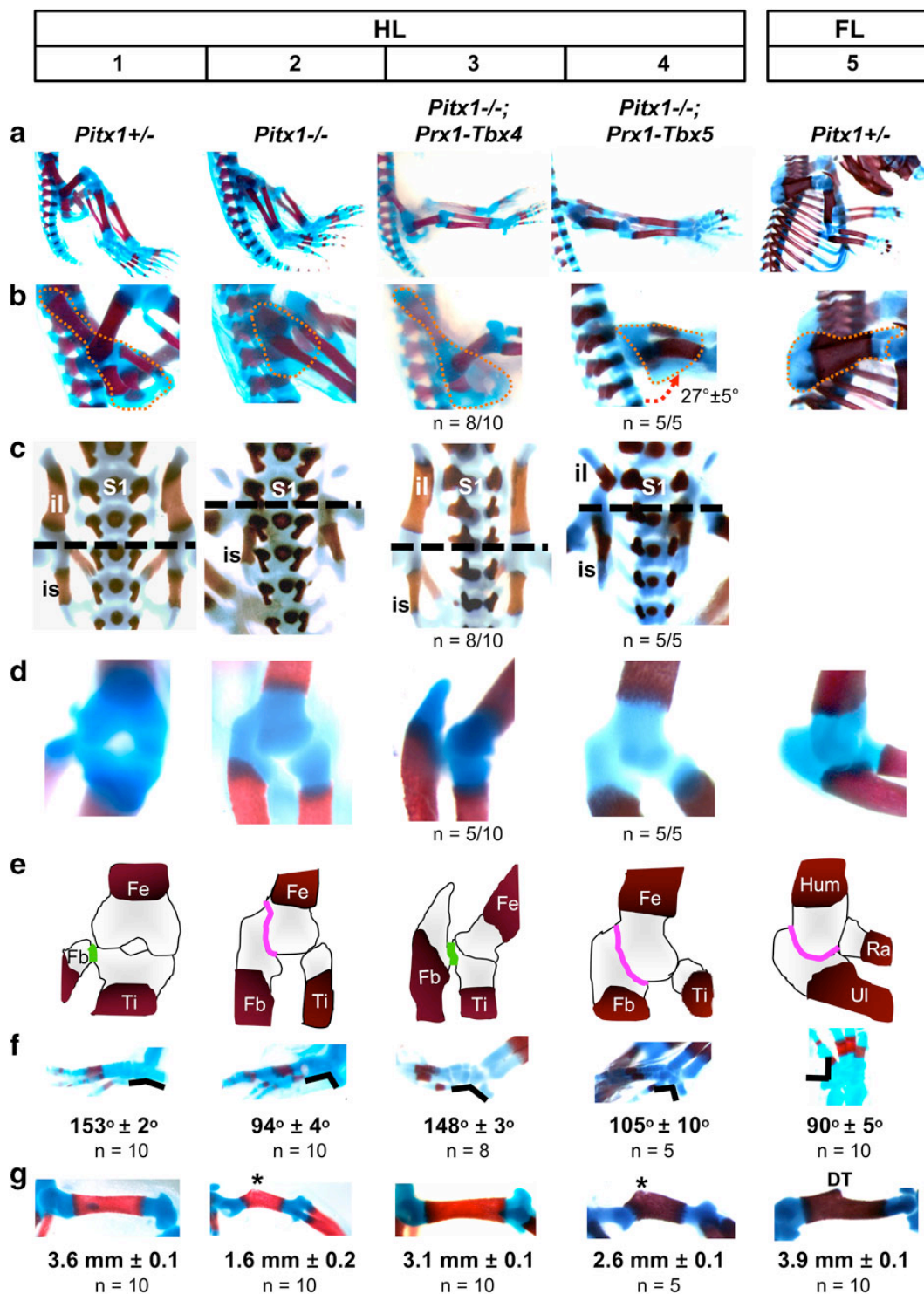
TA, tibialis anterior, ECR, extensor carpi radialis, EDB, extensor digitorum brevis, EIP, extensor indicis propius, n.d., not determined.

**Fig. S2.1. Sequence conservation in Tbx4 and Tbx5 activator domains and in comparison to *Amphioxus* Tbx4/5**

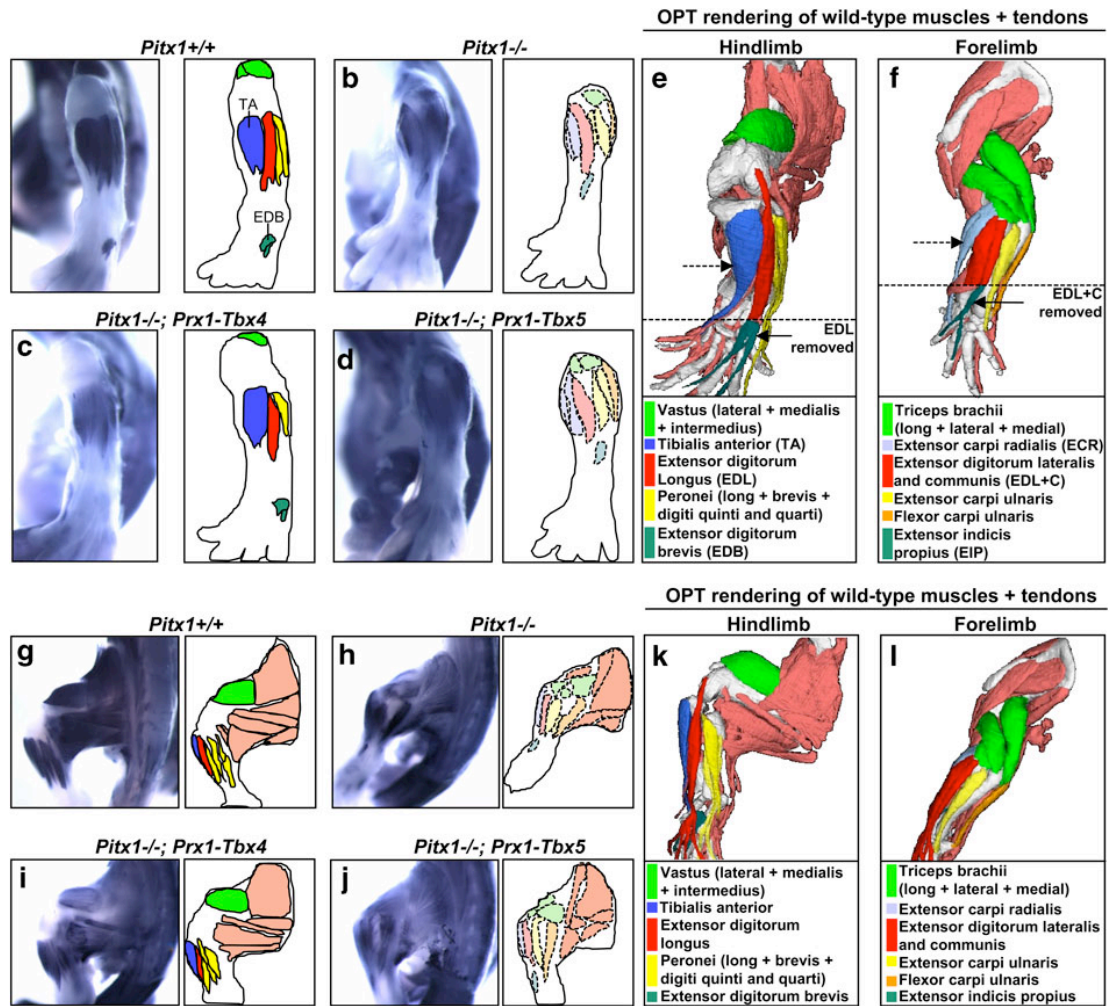
(a) Sequence comparison of Tbx4 and Tbx5 C-terminal activator domains. The Tbx5 activator domain was mapped to this region previously<sup>30</sup>. (b) Sequence identity within the C-termini, the activator domain and Tbx4 repressor domain. (c) Alignment of the *AmphiTbx4/5* region homologous to the mouse Tbx5 activator domain. (d) Sequence conservation in *AmphiTbx4/5* relative to homologous regions of mouse Tbx4 and Tbx5.



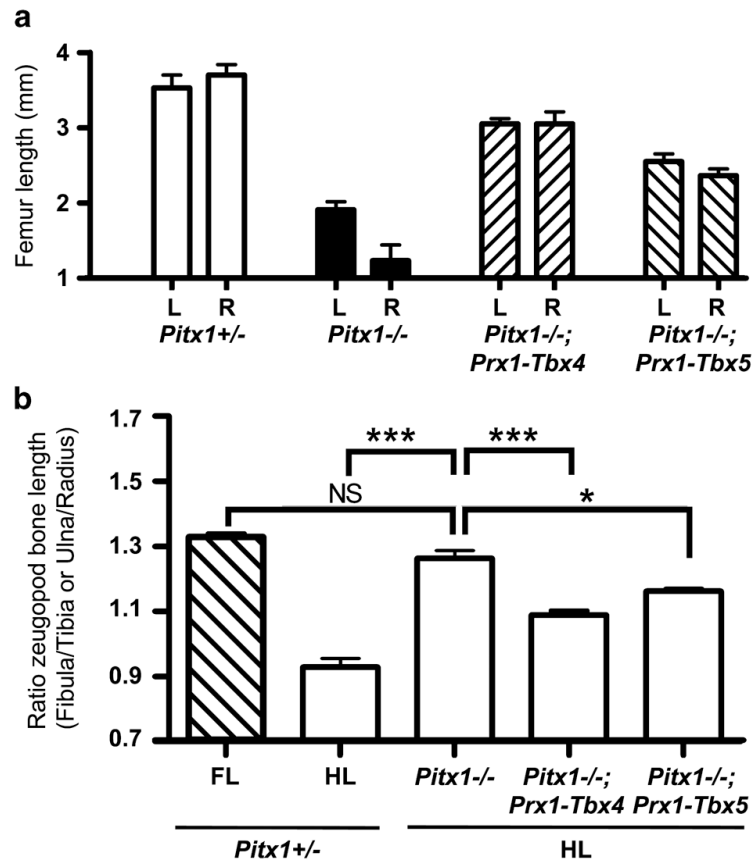
**Figure 2.1 Rescue of *Tbx4* expression in *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb buds.**



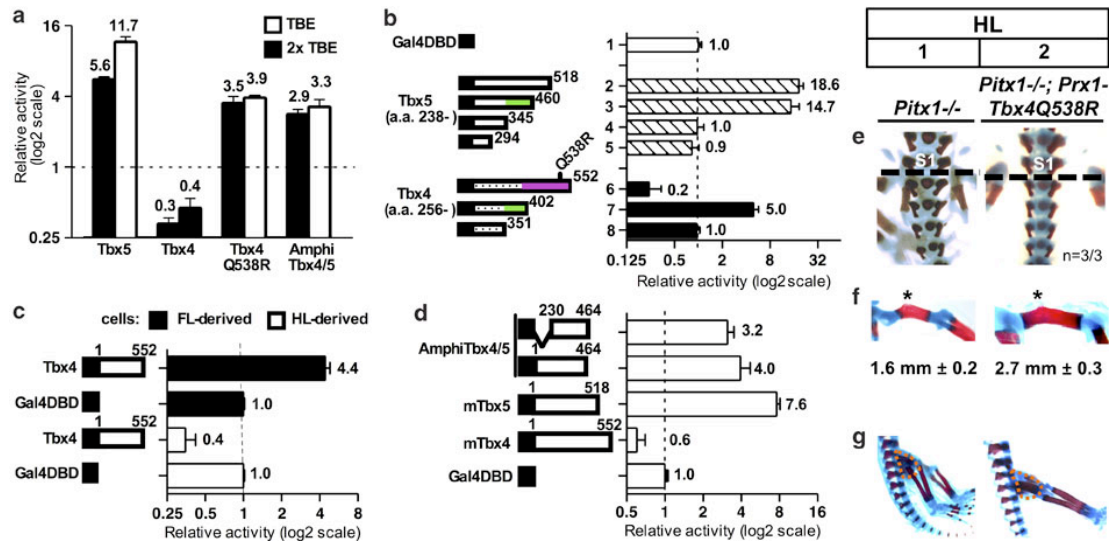
**Figure 2.2** Rescue of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb (HL) skeletal defects by *Tbx4*, but not *Tbx5*.



**Figure 2.3** *Tbx4* rescues muscle patterning of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimbs.



**Figure 2.4 Rescue of *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL bone growth by *Tbx4* and *Tbx5* expression.**



**Figure 2.5** Hindlimb-specific functions of Tbx4 correlate with repressor activity that is lost in human small-patella mutation *TBX4Q531R*.



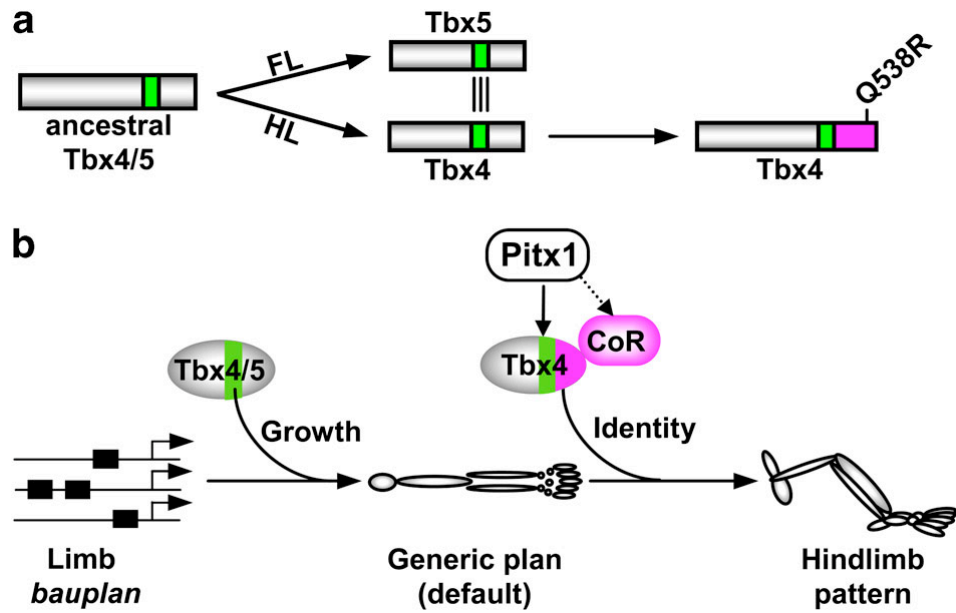


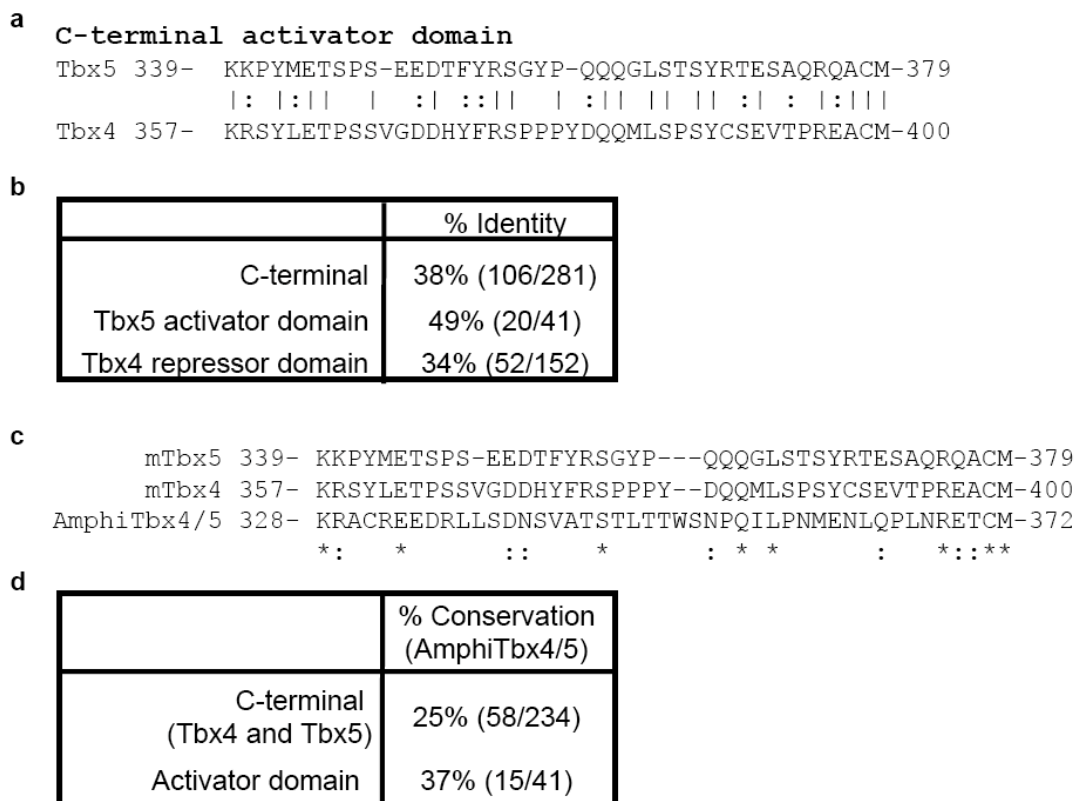
Figure 2.6 Transcriptional basis for evolution of Tbx4/5 roles in limb development.

<b>Pitx1<sup>-/-</sup> HL defects</b>	<b>Phenotypic rescue</b>		
	<b>+ Tbx4</b>	<b>+ Tbx5</b>	<b>+ Tbx4Q538R</b>
<i>Loss of HL features</i>			
Loss of iliac bone	✓	x*	x
Anterior shift of the limb	✓	x	x
Deficient lateral-to-medial rotation	✓	x	x
Loss of patella	x	x	x
<i>HL-to-FL-like transformations</i>			
Knee to elbow bone contacts	✓	x	x
Angle shift of calcaneus/ footplate to pisiform/handplate	✓	x	x
Fibula/tibia width ratio	x	x	x
<i>Altered muscle patterning</i>			
Direct contact between anterior zeugopod and stylopod muscles	✓	x	ND
Split of TA into two muscles (ECR-like)	✓	x	ND
Proximal shift of EDB from autopod to zeugopod (EIP-like)	✓	x	ND
<i>Gain of FL-specific feature</i>			
Appearance on femur of a structure similar to deltoid tuberosity	✓	x	x
<i>Growth defects</i>			
Impaired femur growth	✓	✓	✓
Fibula/tibia length ratio similar to ulna/radius (FL)	✓p	✓p	✓p

Abbreviations: ✓, rescued; ✓p, rescued partially; x, not rescued; ND, not determined; ECR, extensor carpi radialis; EDB, extensor digitorum brevis; EIP, extensor indicis propius; FL, forelimb; TA, tibialis anterior.

\*In addition, Tbx5 increased the HL girdle/spine angle, towards a FL-like position.

**Table 2.1 Summary of *Pitx1*<sup>-/-</sup> hindlimb defects and rescue by *Tbx4*, *Tbx5* and *Tbx4Q538R*.**



**Figure S2.1 Sequence conservation in Tbx4 and Tbx5 activator domains and in comparison to Amphioxus Tbx4/5**

## **CHAPITRE 3**

### Chapitre 3 : Prmt7 acts as a transcriptional co-repressor of Tbx4

Jean-François Ouimette and Jacques Drouin.

Laboratory of Molecular Genetics

Institut de recherches cliniques de Montréal

Montréal QC Canada H2W 1R7

\*Contact information: Jacques Drouin

Laboratoire de Génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110, avenue des Pins Ouest

Montréal Québec H2W 1R7

CANADA

### **3.1 Contribution :**

J'ai directement fait toutes les expériences présentées. Mon superviseur, Jacques Drouin et moi avons fait le design expérimental, analysé les résultats et écrit le manuscrit en étroite collaboration. Ce travail constitue le fruit de l'étude du mécanisme moléculaire de Tbx4 et Tbx5.

### **3.2 Abstract :**

Tbx4 and Tbx5 have been implicated in determination of limb identity, through divergent transcriptional activities. Indeed, we have previously shown that, contrary to Tbx5 that strictly behaves as an activator, Tbx4 acts as both activator and repressor of transcription. Here, we have investigated the molecular basis of these properties and in particular, the requirements for Tbx4 repressor activity. We have delineated the Tbx4 repressor domain and found that Tbx4 specifically represses transcription in hindlimb-derived cells but not in cells from forelimbs. We conducted a yeast two-hybrid screen to isolate a putative hindlimb co-repressor of Tbx4. We could thus identify Prmt7, an arginine methyltransferase, which restores Tbx4 repressor activity in cells that do not support this activity. We also find that Prmt7 is preferentially expressed in hindlimb buds. Together, these results suggest that Prmt7 associates with Tbx4 to confer its repressor activity, a property that is essential for determination of limb identity determination.

### 3.3 Introduction

Limb development was shown to depend on the T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* in order to insure proper growth. Indeed, inactivation of these genes produces growth defects, severe in the case of *Tbx5* where no forelimb (FL) buds are formed but milder in the absence of *Tbx4*, where hindlimb (HL) buds form but do not continue their normal development as evidenced by proximal limb skeletal truncations (Agarwal et al. 2003; Rallis et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2007). These limb growth defects have been associated with the genetic interaction between *Tbx5/Tbx4* and the *Wnt/Fgf10* signaling cascades. In order to initiate bud outgrowth of the FL and HL, *Tbx5* and *Tbx4*, respectively, were shown to be required for the expression of the limb growth initiation gene *Fgf10* (Ng et al. 2002; Agarwal et al. 2003; Rallis et al. 2003; Takeuchi et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2007). It appears that the T-box factors gene directly activate the *Fgf10* gene through binding of a T-box binding element (TBE) in the proximal promoter (Agarwal et al. 2003; Koshiba-Takeuchi et al. 2006). Genetic studies in mice have suggested that *Tbx4* and *Tbx5* are required for growth of the limbs at the early phase of bud formation and outgrowth (Hasson et al. 2007; Naiche et Papaioannou 2007). In spite of their continued expression, late conditional inactivation of *Tbx4* and *Tbx5* does not seem to perturb limb development. These results have led to the model that both genes have equivalent activities involved in early limb development and specifically in limb outgrowth. However, human mutations in these genes produce very differing limb phenotypes. On one hand, *TBX5* mutations, shown



to be involved in the etiology of Holt-Oram syndrome (HOS [MIM 142900]), that includes a wide range of forelimb growth defects. On the other hand, *TBX4* mutations, associated with the small-patella syndrome (SPS [MIM 147891]), lead to hindlimb defects, affecting mainly the patella, hipbone and in some patients, the foot.

We have recently shown that in addition to being growth-promoting limb factors through their transcriptional activator domain, Tbx4 and Tbx5 differ in their capacity to restore HL identity in the *Pitx1*<sup>-/-</sup> mouse model (Ouimette et al. 2010). Importantly, we associated this capacity with a repressor activity that is unique to Tbx4; when inactivated by a SPS-causative mutation, the loss of repressor activity prevents the Tbx4-dependent rescue of *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL identity. While these results may appear contradictory with prior experiments showing that Tbx4 is not able to implement HL identity to wild-type or rescued FL (Minguillon et al. 2005; DeLaurier et al. 2006; Minguillon et al. 2009), we could also show that the Tbx4 repressor activity is restricted to HL-derived cells: consequently in FL-derived cells, Tbx4 behaved as a transcriptional activator. This led us to postulate that a HL-restricted co-repressor is essential for Tbx4 repressor activity. In the present study, we report the characterization of the Tbx4 repressor activity and show that transcriptional activity of Tbx4 is greatly dependent on context. In order to identify relevant Tbx4 co-factors, we conducted a yeast two-hybrid screen and identified Prmt7, an arginine methyltransferase, as candidate Tbx4 co-repressor as it is sufficient to reconstitute

Tbx4 repressor activity. Together, these results provide a novel mechanism for transcriptional repression by T-box transcription factors.

### 3.4 Results

#### Divergent transcriptional activities of Tbx4 and Tbx5

Having previously demonstrated the divergent capacity of Tbx4 and Tbx5 to rescue the identity of Pitx1-deficient HL, we investigated how this discrepancy is due to different transcriptional properties. Using a T-box binding element (TBE) promoter driving luciferase expression, we tested the activities of Tbx4, Tbx5 and Tpit (Tbx19) in CV1-cells. We observed significant repression by Tbx4 at the highest dose using both reporters containing either one or two TBE (Fig. 3.1A). This activity contrasts with those of Tbx5 and Tpit that produces equally strong activation of the TBE reporters (Fig. 3.1A). As this transcription assay relies on T-box DNA binding capacities, we compared Tbx4, Tbx5 and Tpit DNA binding ability using a TBE probe in gel retardation assays. As previously described (Pulichino et al. 2003), Tpit binds this sequence as both monomer (Fig. 3.1B, black arrow) and dimer (Fig. 3.1B, open arrow). Similarly, both Tbx4 and Tbx5 bind the TBE probe as monomers and dimers although with apparent differing affinities; while Tbx4 and Tpit seem to have equivalent affinities for the TBE consensus sequence, Tbx5 clearly shows stronger binding to this sequence. Given the apparent similarity between Tbx4 and Tpit DNA-binding affinities, Tbx4-dependent transcriptional repression is unlikely due to differences in DNA binding. However in light of the discrepancy for in vitro binding between Tbx4 and Tbx5, it may be difficult to compare transcriptional activities differences and we thus relied on the

yeast Gal4 DNA-binding domain (DBD) and an upstream activator sequences (UAS)-based transcriptional assay to assess the activities of Tbx4 and Tbx5 independently of promoter binding (Fig. 3.1C). As previously described, Tbx5 behaved as a strong activator of transcription in this context (Zaragoza et al. 2004). Moreover, this activity is ascribed to an activator domain located in the C-terminus, between amino acids (aa) 345 and 460. We also observed weak activation by the Tbx5 N-terminus, but this is not statistically significant. As it did in its full length form, Tbx4 also behaved as a transcriptional repressor when fused to the Gal4 DBD, an activity that we located between aa 402-501. Interestingly, deletion of this region unveils an activator domain between aa 351 and 402, which shows significant sequence conservation with the corresponding region in Tbx5 (Zaragoza et al. 2004; Ouimette et al. 2010). Taken together, these results suggest that Tbx4 behaves dominantly as a transcriptional repressor but additionally bears an activator domain while Tbx5 only possesses the latter.

#### **Cell-specific repressive activity of Tbx4**

We sought to investigate the requirements for the Tbx4 repressor activity by using an array of cells lines. Strikingly, whereas Tbx4 behaved as a repressor in CV-1 cells (Fig. 3.2A), it showed no activity in HEK293 (Fig. 3.2B) and behaved as an activator in C3H10T1/2 cells (Fig. 3.2C). These highly divergent results prompted us to investigate the Tbx4 activity in HL bud cells,

where it is normally expressed. We thus derived primary cultures of e11.5 limb bud cells of both FL and HL origin. In HL-derived cells, Tbx4 displayed a transcriptional repressor activity when fused to the Gal4DBD and its repressor domain maps to the C-terminus (Fig. 3.2D). We also assessed Tbx5 activity in FL-derived cells, where it behaved as a robust transcriptional activator. Intriguingly, whereas Tbx5 also activated transcription in HL-derived cells, albeit with lower potency, Tbx4 did not display its repressive activity in FL-derived cells. In fact, Tbx4 rather behaved as a transcriptional activator in these cells, reflecting the activity observed in C3H10T1/2 cells. These results highlight the specificity of the HL cell context in order to elicit Tbx4 repressor activity. Furthermore, it clearly suggest that the existence of a HL-restricted Tbx4-specific co-repressor necessary to support this activity.

### **Identification of Tbx4 partners by yeast two-hybrid**

To identify the HL-restricted Tbx4 co-factor essential for its repressor activity, we conducted a yeast two-hybrid screen using a cDNA library that we constructed from e12 HL bud mRNA. To screen this library, we used a bait derived from aa 73 to 501 of Tbx4, comprising the T-box DNA binding domain and all but the last 51 aa of its C-terminus, which are not essential for Tbx4 repressor activity. This construct showed robust expression in yeast (Supplementary Fig. 3.1) and when used to screen by yeast two-hybrid, produced 304 independent blue colonies after 21 days of selection

(Supplementary Table 3.1). Among those, we found some previously described transcriptional regulators and even a previously described partner of Tbx5,  $\beta$ -catenin (Agarwal et al. 2003). Co-expression of  $\beta$ -catenin with Tbx5 has been shown to potentiate its activation of the *Fgf10* promoter (Agarwal et al. 2003). Since  $\beta$ -catenin was shown to act as a co-activator, we focused on the other candidates by first assessing their limb expression by RT-qPCR (Fig. 3.3A). While *Ctbp1*, *Rbbp4*, *Rbm39* and *Tgf- $\beta$ 1i1* showed equal expression in e12 FL and HL, we could identify an enrichment of *Prmt7* and *Dnmt1* in the HL. We assessed their expression by wholemount *in situ* hybridization at e13 and could not detect any significant *Prmt7* expression in the embryo. However, we could effectively detect enriched expression of *Dnmt1* in the hindlimbs, especially in the anterior portion of the HL (Fig. 3.3C,D).

### **Prmt7 is sufficient to reconstitute Tbx4 repressor activity**

Having shown that Tbx4 activity is context-dependent, we sought to explore the properties of the candidate co-factors identified in the screen. In particular, we tested the ability of the 6 putative co-factors identified in the yeast two-hybrid screen to restore Tbx4 dominant repressor activity in C3H10T1/2 cells. While 5 out of these 6 candidates had non-significant effects on Tbx4 activity (data not shown), Prmt7 was sufficient to restore the repressor action of Tbx4 on a TBE-based reporter in these cells (Fig. 3.4A), whereas Prmt7 had no effect on its own on this reporter. Interestingly, co-

expression of Prmt7 with Tbx5 did not modify its activity (Fig. 3.4A), demonstrating a functional specificity in the Prmt7-Tbx4 transcriptional interaction. The human small-patella syndrome causative TBX4Q531R mutation converts aa 531 (538 in the mouse) from glutamine to arginine. We have previously shown that this mutation inactivates the repressor activity of Tbx4, converts it into a transcriptional activator and renders it unable to rescue HL identity of *Pitx1*<sup>-/-</sup> HL (Ouimette et al. 2010). We thus tested the effect of Prmt7 on the mutant Tbx4Q538R and found it to be less sensitive to Prmt7 than wild-type Tbx4 (Fig. 3.4A). Indeed, whereas Prmt7 converts Tbx4 to a repressor in these cells, Tbx4Q538R still behaves as an activator in presence of Prmt7, albeit with lesser activity.

Prmt7 is a member of 8-member family of arginine methyltransferase and behaves as a type II methyltransferase, catalyzing the addition of symmetric dimethyl groups (Lee et al. 2005). It was previously shown to display cytoplasmic localization in HEK293 cells (Herrmann et al. 2009) but nuclear localization in COS cells (Lee et al. 2005). In order to further refine the nature of the activity of Prmt7 on Tbx4, we assessed Prmt7 localization in C3H10T1/2 cells. It was previously reported that these cells express Prmt7 at a basal level during G1. We could observe using an antibody against Prmt7 that it is expressed in a subset of C3H10T1/2 (Fig. 3.4C). This expression is found in the nuclear compartment, although it does not seem restricted to the nucleus (Fig. 3.4C). Expression of Tbx4 did not affect Prmt7 nuclear localization (Fig. 3.4F). In this context, we also see broad expression of Tbx4

throughout the cell (Fig 3.4E). Together, these results provide the first characterization of Tbx4 repressor activity, an activity essential for its function during limb development. Furthermore, we provide compelling evidence for the implication of Prmt7 in this identity-specifying activity of Tbx4.



### 3.5 Discussion

Previous studies have suggested that Tbx4 and Tbx5 are not involved in the determination of limb identity (Agarwal et al. 2003; Hasson et al. 2007; Naiche et Papaioannou 2007) but rather play an equivalent role in the early outgrowth of the HL and FL, respectively (Agarwal et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2003; Rallis et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2007). Recently, we showed that Tbx4 and Tbx5 are indeed important for determination of limb identity; precisely, we could demonstrate that Tbx4 is critical in the determination of hindlimb identity through a mechanism that is not shared with Tbx5. In the present report, we further defined the molecular requirements for the HL-specific Tbx4 repressor activity.

We were able to demonstrate that this ability is context-dependent. Indeed, while Tbx5 behaves as a strong transcriptional activator in all cell lines assessed, Tbx4 activity varies from cell to cells. In CV-1 cells, Tbx4 is a dominant repressor, but deletion of its repressor domain unveils an activator domain. This cell line is thus permissive for both activities, a result further confirmed using the Tbx4Q531R mutant (Ouimette et al. 2010). However, Tbx4 does not display any activity in HEK293 cells and C3H10T1/2 cells, considered to be mesenchymal pluripotent cells (Reznikoff et al. 1973; Pinney et Emerson 1989), Tbx4 and Tbx5 display similar activator properties. The latter cell line adds a significant result since the activity in those cells, originally derived from e15 to e17 C3H mouse embryos, contrast with the activity of

Tbx4 in primary culture cells derived from e11.5 HL limb buds, where Tbx4 displays a dominant repressive activity. The discrepancy between these cells clearly suggested the existence of a specific HL Tbx4 co-repressor. This was further supported by the fact that while HL-derived cells can support this Tbx4 repressor activity, FL-derived cells only reveal for Tbx4-dependent activation of transcription.

Identification of Prmt7 through the yeast two-hybrid screen provided a good candidate for this HL-specific co-repressor. Its expression is enriched in e12 HL in comparison to FL. Significantly, co-expression of Prmt7 and Tbx4 in C3H10T1/2 recapitulates the activity seen in the HL-derived primary cells. Previous reports have investigated the expression of Prmt7 in this cell line and found that its expression is tightly regulated during the cell cycle, being restricted to the G1 phase (Gros et al. 2006). Whether this restriction of expression underlies the absence of repressive activity of Tbx4 remains to be determined. Nonetheless, forced expression of Prmt7 is sufficient to restore this Tbx4-specific activity. Preliminary studies show that this effect is not mediated by the modulation of Tbx4 cellular distribution, as is the case with the Tbx5-LMP4 regulation (Krause et al. 2004). It thus seems plausible that Tbx4 and Prmt7 modulate transcription via an effect on the transcriptional machinery. Prmt7 is a type II protein arginine methyltransferase that, like Prmt5, has been described to synthesize symmetric dimethylarginine (sDMA) (Lee et al. 2005). It will be interesting to determine whether the Tbx4-Prmt7 interaction is relevant *in vivo* for Tbx4-directed repression during limb

development, for example by inducing the stable repression of specific developmental gene, as is the case with Prmt5 (Rank et al. 2010). A similar activity has been previously described for Prmt7 in the imprinting of the *H19* locus via its recruitment by CTCFL to the *H19* control region (Jelinic et al. 2006). In this context, it was shown that induction of the symmetrical dimethylation of H2A and H4 triggers the recruitment of DNA methyltransferase that induce global methylation of the locus. Significantly, it was also shown that Prmt7 by itself does not interact *in vivo* with the histones (Jelinic et al. 2006), highlighting the importance of specific transcription factors to target Prmt7 activity. Interaction between Tbx4 and Prmt7 could thus be sufficient to induce the repression of various Tbx4 genomic targets. Such an action could fully account in the cell fate change presumably required to influence limb morphology and identity.

### 3.6 References

Agarwal, P, Wylie, JN, Galceran, J, Arkhitko, O, Li, C, Deng, C, Grosschedl, R and Bruneau, BG (2003). "Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo." Development **130**(3): 623-633.

DeLaurier, A, Schweitzer, R and Logan, M (2006). "Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb." Dev Biol **299**(1): 22-34.

Gros, L, Renodon-Corniere, A, de Saint Vincent, BR, Feder, M, Bujnicki, JM and Jacquemin-Sablon, A (2006). "Characterization of prmt7alpha and beta isozymes from Chinese hamster cells sensitive and resistant to topoisomerase II inhibitors." Biochim Biophys Acta **1760**(11): 1646-1656.

Hasson, P, Del Buono, J and Logan, MP (2007). "Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth." Development **134**(1): 85-92.

Herrmann, F, Pably, P, Eckerich, C, Bedford, MT and Fackelmayer, FO (2009). "Human protein arginine methyltransferases in vivo--distinct properties of eight canonical members of the PRMT family." J Cell Sci **122**(Pt 5): 667-677.

Jelinic, P, Stehle, JC and Shaw, P (2006). "The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation." PLoS Biol **4**(11): e355.

Koshiba-Takeuchi, K, Takeuchi, JK, Arruda, EP, Kathiriya, IS, Mo, R, Hui, CC, Srivastava, D and Bruneau, BG (2006). "Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart." Nat Genet **38**(2): 175-183.

Krause, A, Zacharias, W, Camarata, T, Linkhart, B, Law, E, Lischke, A, Miljan, E and Simon, HG (2004). "Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development." Dev Biol **273**(1): 106-120.

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**(2): 421-433.

Lancôt, C, Moreau, A, Chamberland, M, Tremblay, ML and Drouin, J (1999). "Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene." Development **126**(9): 1805-1810.

Lee, JH, Cook, JR, Yang, ZH, Mirochnitchenko, O, Gunderson, SI, Felix, AM, Herth, N, Hoffmann, R and Pestka, S (2005). "PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine." J Biol Chem **280**(5): 3656-3664.

Minguillon, C, Del Buono, J and Logan, MP (2005). "Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth." Dev Cell **8**(1): 75-84.

Minguillon, C, Gibson-Brown, JJ and Logan, MP (2009). "Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21726-21730.

Naiche, LA and Papaioannou, VE (2003). "Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois." Development **130**(12): 2681-2693.

Naiche, LA and Papaioannou, VE (2007). "Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth." Development **134**(1): 93-103.

Ng, JK, Kawakami, Y, Buscher, D, Raya, A, Itoh, T, Koth, CM, Rodriguez Esteban, C, Rodriguez-Leon, J, Garrity, DM, Fishman, MC and Izpisua Belmonte, JC (2002). "The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10." Development **129**(22): 5161-5170.

Ouimette, J-F, Jolin, ML, L'honoré, A, Gifuni, A and Drouin, J (2010). "Divergent transcriptional activities determine limb identity." Nature Communications **1**: 1-9.

Pinney, DF and Emerson, CP, Jr. (1989). "10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation." Environ Health Perspect **80**: 221-227.

Pulichino, AM, Vallette-Kasic, S, Tsai, JP, Couture, C, Gauthier, Y and Drouin, J (2003). "Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation." Genes Dev **17**(6): 738-747.

Rallis, C, Bruneau, BG, Del Buono, J, Seidman, CE, Seidman, JG, Nissim, S, Tabin, CJ and Logan, MP (2003). "Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth." Development **130**(12): 2741-2751.

Rank, G, Cerruti, L, Simpson, RJ, Moritz, RL, Jane, SM and Zhao, Q (2010). "Identification of a PRMT5-dependent repressor complex linked to silencing of human fetal globin gene expression." Blood.

Reznikoff, CA, Brankow, DW and Heidelberger, C (1973). "Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division." Cancer Res **33**(12): 3231-3238.



Takeuchi, JK, 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**(12): 2729-2739.

Zaragoza, MV, Lewis, LE, Sun, G, Wang, E, Li, L, Said-Salman, I, Feucht, L and Huang, T (2004). "Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal." Gene **330**: 9-18.

### 3.7 Methods

#### Cell culture and transfection

CV-1, COS and 10T1/2 cells were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method. Briefly, 40000 cells per well were plated in 12-well-plates. For each well, a total of 3  $\mu\text{g}$  DNA was used (1.5  $\mu\text{g}$  reporter plasmid, 0-0.75  $\mu\text{g}$  effector plasmid or empty expression vector, 25 ng of CMV- $\beta$ -galactosidase as internal control and 0-0.75  $\mu\text{g}$  carrier pSP64 DNA). TBE-Luc and 5xUAS-Luc reporter plasmids were used. Sixteen hours after transfection, media was changed and cells harvested 24 h later, using lysis buffer [0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM dithiothreitol (DTT)]. Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were assayed in lysates with a luminometer using the luciferin substrate (Gold biotechnology) or the Galacto-Light system (TROPIX). Mouse embryonic limb derived cells were isolated and transfected as described previously (Ouimette et al. 2010). Cells were isolated from e11.5 CD1 mouse embryos with collagenase (0.1%; Worthington), cells per well were plated in 12-well plates. The Effectene reagent (QIAGEN) was used to transfect 50000 cells with 0.3  $\mu\text{g}$  of DNA (100ng reporter plasmid, 0-100 ng effector plasmid, 20 ng of CMV- $\beta$ -galactosidase and 80 ng of pSP64 DNA), following manufacturer recommendations.

### **Gel retardation assays**

The Tbx4, Tbx5 and Tpit protein were produced in vitro using the TNT reticulocytes kit (Promega) and quantities were assessed via S<sup>35</sup>-Methionine labeling and gel quantification. Binding reactions were performed on ice for 60 min in a total volume of 20 µl containing 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'2-ethane-sulfonic acid (HEPES at pH7.9), 84 mM KCl, 5 mM DTT, 10% glycerol, 1 µg of poly[d(I-C)] (nonspecific competitor DNA) with 4 femtomoles (50,000 cpm) of 5' end-labeled oligonucleotide probes and 1, 2 or 5µl of in vitro translated proteins. For supershift experiments, antibodies were added to the mix during the last 20 min of the incubation. Samples were run for 3 hrs at 200 V on 5% polyacrylamide gel in 80 mM Tris-HCl/390 mM glycine (pH 8.5) at 4°C.

### **Yeast two-hybrid screen**

To identify Tbx4-interacting proteins, we employed the yeast two-hybrid system (Matchmaker Gal4 System 3; Clontech). Briefly, Tbx4 PCR fragments were subcloned into the Gal4 DNA-binding-domain vector pGBKT7. These Tbx4 baits were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (ADE2, HIS3, lacZ, and MEL1) using manufacturer's recommendations. Transformants were tested for expression of the Gal4-Tbx fusion protein by immunoblotting using anti-Gal4DBD (sc-577). cDNA library was generated from polyA mRNA obtained from RNA isolated (RNeasy) and purified

(Oligotex; Qiagen) from e12 limb buds homogenized in Trizol (Invitrogen) using the cDNA synthesis kit (Stratagene) according to manufacturer's recommendations. The cDNA library was cloned in the yeast vector pGADT7 (Clontech) whereas Tbx4 baits were cloned in pGBKT7 vector (Clontech). The AH109 yeast cells co-transformed with both the Tbx4 T-box/C-terminus bait and the prey cDNA library. Approximately  $2 \times 10^8$  yeast transformants were selected for 21 days on glucose plates lacking His, Trp, Leu, and Ura and  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal). Colonies were re-screened for interaction of bait and prey using a secondary selection the same glucose plates. Colonies that were blue were selected and positive clones were sequenced using the T7 promoter from bacteria-transformed DNA.

### **RNA quantification**

RNA extractions were performed using RNeasy mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen) on hindlimb and forelimb buds dissected at the indicated embryonic times. For cDNA synthesis, SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT on 100 ng of total RNA was used. Quantitative real time PCR (MX-3005; Stratagene, La Jolla, CA) was performed with cDNA and the SYBR Green kit (Qiagen). Oligonucleotides used to measure relative abundance are listed in Table S1.

### **Preparation and characterization of affinity-purified anti-Tbx4 antibody**

Antibodies were raised in rabbits using 100 µg MBP-Tbx4 fusion protein in the primary injection and three subsequent boosts. Affinity purification was performed as previously described (Lanctôt et al. 1999) with GST-Tbx4 columns. Two different antisera were produced against MBP fusion antigens containing amino acids 1–72 or amino acids 333–397 of the mouse Tbx4 protein.

### **Histology, immunohistochemistry and immunofluorescence**

Immunofluorescence was performed as described (L'honoré et al. 2007) using rabbit anti-Tbx4 (1/250), rabbit anti-Prmt7 (1/250; abcam 22110). Biotinylated anti-rabbit-Alexa 488 or 546, and streptavidin-Alexa 488 or 546 (Vector Labs, 1/150) were used as secondary or tertiary antibodies. Slides were mounted using Vecta-Shield (Vector Labs).

### **3.8 Footnotes**

#### **Acknowledgements**

We thank Lise Laroche for secretarial assistance. The work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J. D.

**Correspondence and requests** for materials should be addressed to J.D.

**Competing financial interest.** The authors declare no competing financial interests.

### 3.9 Figure Legends

#### Figure 3.1: Tbx4 and Tbx5 display divergent transcriptional activities

**A.** Tbx4, Tbx5 and Tpit activity was assessed in CV-1 cells on reporters containing either one or two T-box binding elements (TBE). (n=5). Error bars indicate s.e.m. (n=5). \*  $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,01$  compared to control. **B.** Gel retardation assay on a probe containing two TBE with the indicated quantity of in vitro translated Tbx4, Tbx5 and Tpit protein. Lane 5 and 9 show supershifts obtained with antibodies directed against Tbx4 and Tbx5, respectively. Black arrow represents monomer, white arrow dimers. **C.** Analysis of Tbx4/Tbx5 using Gal4 DNA binding domain (DBD) fusions. Amino acid end-positions are indicated. Error bars indicate s.e.m. (n=5).

#### Figure 3.2 Context-dependent Tbx4 and Tbx5 activity

**A-C.** Tbx4, Tbx5 activity was assessed in indicated cell lines on a reporter containing one TBE. (n=5). Error bars indicate s.e.m. p values are compared to control. **D.** Analysis of Tbx4/Tbx5 using Gal4 DNA binding domain (DBD) fusions in forelimb (FL)-derived and hindlimb (HL)-derived cells. Error bars indicate s.e.m. (n=5).

**Figure 3.3 Expression of Tbx4 putative co-factors identified by yeast two-hybrid screen**

**A.** Relative expression of messenger RNA indicated between e12.5 hindlimbs and forelimbs. Primers used are indicated in Supplementary Table1. Error bars indicate s.e.m. **B-D.** Embryonic expression detected by wholemount in situ hybridization of *Prmt7* and *Dnmt1*. **D.** Higher magnification of the forelimb and hindlimb.

**Figure 3.4 Prmt7 is sufficient to reconstitute Tbx4 repressor activity.**

**A.** Effect of Prmt7 on the activity of Tbx4, Tbx4Q538R and Tbx5 in C3H10T1/2 cells as measured on a reporter containing one TBE. Error bars indicate s.e.m (n=3) **B-F.** Intracellular localization of Prmt7 in non-transfected cells (B, C) and Tbx4 transfected C3H10T1/2 cells (D-F).



**Supplementary Table 3.1**

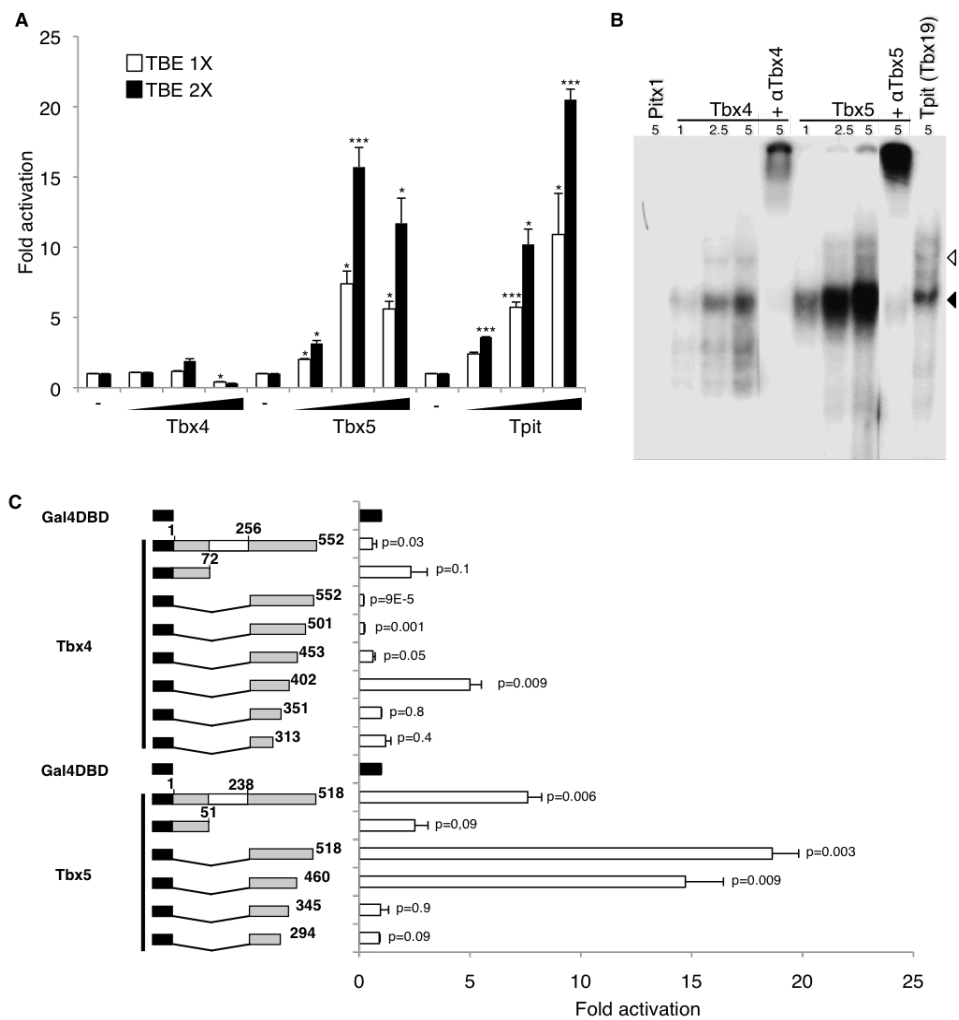
Oligonucleotides used to quantitate limb messenger RNA abundance of the indicated genes.

**Supplementary Table 3.2**

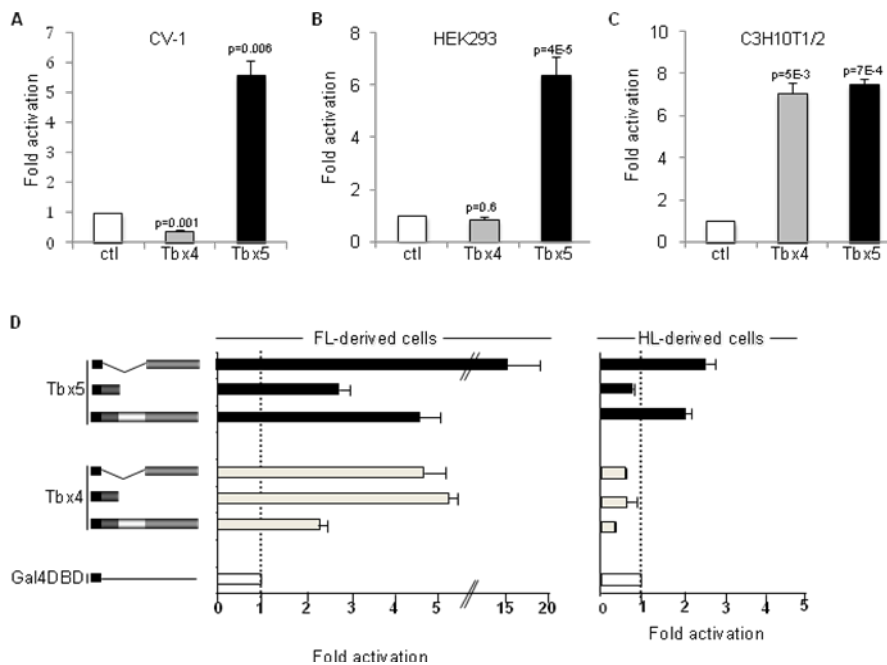
Yeast two-hybrid clones isolated from the screen of a HL cDNA library by a Tbx4 bait.

**Supplementary Figure 3.1 Characteristics of the Tbx4-expressing yeasts used for the two-hybrid screen.**

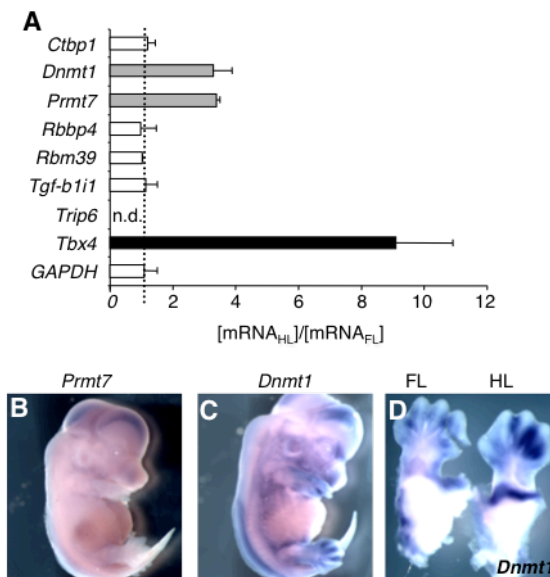
**A.** Schematic of indicated Tbx4 baits and their growth on the indicated yeast minimal media (L, leucine; W, tryptophan; A, Adenine; H; Histidine). Checkmark indicate growth, X indicate failure to grow. **B.** Expression of Gal4DBD-Tbx4 fusion protein in yeast. Molecular weight are indicated. **C.** Growth curves of the two indicate Tbx4 bait, of an untransformed yeast (-) and empty vector (+) in complete yeast media.



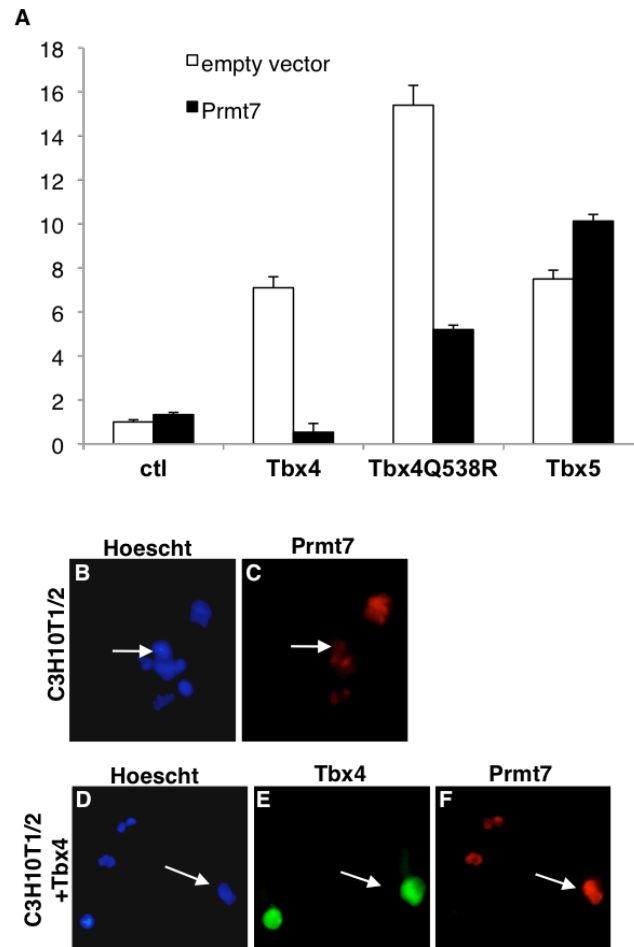
**Figure 3.1 Tbx4 and Tbx5 display divergent transcriptional activities**



**Figure 3.2 Context-dependent Tbx4 and Tbx5 activity**



**Figure 3.3** Expression of *Tbx4* putative co-factors identified by yeast two-hybrid screen



**Figure 3.4 Prmt7 is sufficient to reconstitute Tbx4 repressor activity.**

<b>Gene</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<i>Dnmt1</i>	TGGTACAACCAGGAGTACGCAA	AAAGTAAAGGCCTCGGGAGGAA
<i>Ctbp1</i>	ACTGCACAGTGGAGATGCCTAT	GCTGCCAATTCGGACGATGATT
<i>Rbbp4</i>	TGGTGGTCACACTGCCAAGATA	GGTGGTTTGGGCTTGTAGCATT
<i>Tgf-<math>\beta</math>1i1</i>	AGCTAGACCGTTTGCTTCAGGA	ACAGTGGGTGAGCTCTTGTCTT
<i>Prmt7</i>	TGTGAGCAGGGTGAAAGACAGA	ACTGAAGCCATTCCTCTCCACA
<i>Rbm39</i>	TGAGGAAAGGGATGCAAGGACT	TCTGCCTGTGATGCCTGAACTA
<i>Trip6</i>	TATGTGGCCACCCTGGAGAAAT	TCCTCACACTTGTAACAGCCGA
<i>Tbx4</i>	ACAACAAATGGATGGTCGCAGG	TTCTCGTCGGCCTTAACGATGT
<i>GAPDH</i>	TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT	ACTGTGCCGTTGAATTTGCC

**Supplementary Table 3.1**

Name	Symbol	Accession Number	Start pos.	CDS pos.
ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1	Arfgap1	<a href="#">NM_145760.2</a>	2300	279..1523
ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2	Ankra2	<a href="#">NM_023472.1</a>	601	332..1270
ariadne homolog 2 (Drosophila)	Arih2	<a href="#">NM_011790.3</a>	729	306-1784
ataxin 2	Atxn2	<a href="#">NM_009125.2</a>	2875	28..3888
basic helix-loop-helix domain containing, class B9	Bhlhb9	<a href="#">NM_198161.1</a>	646	140..1759
brain and reproductive organ-expressed protein	Bre	<a href="#">NM_181280.1</a>		89..1213
C-terminal binding protein 1	Ctbp1	<a href="#">NM_013502.2</a>	674	152..1477
carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase	Chst14	<a href="#">NM_028117.2</a>	912-1352	129..1259
carboxypeptidase E	Cpe	<a href="#">NM_013494.3</a>	305	92..1522
Casitas B-lineage lymphoma-like 1	Cbll1	<a href="#">NM_134048.1</a>	1035	6..1478
catenin (cadherin associated protein), beta 1	Ctnnb1	<a href="#">NM_007614.2</a>	954	213..2558
cathepsin B	Ctsb	<a href="#">NM_007798.2</a>	602	127..1146
cathepsin L	Ctsl	<a href="#">NM_009984.3</a>	137	83..1087
chaperonin subunit 7 (eta)	Cct7	<a href="#">NM_007638.3</a>	794	50..1684
coiled-coil domain containing 85A	Ccdc85a	<a href="#">NM_181577.3</a>	1814	755..2257
complement component 1, q subcomponent, C chain	C1qc	<a href="#">NM_007574.2</a>	388	73..813
cytochrome b-245, alpha polypeptide	Cyba	<a href="#">NM_007806.2</a>	36	61..639
damage specific DNA binding protein 1	Ddb1	<a href="#">NM_015735.1</a>	3735	82..3504
DAZ interacting protein 1	Dzip1	<a href="#">NM_025943.2</a>	309	255..2813
dipeptidylpeptidase 7	Dpp7	<a href="#">NM_031843.2</a>	858	6..1526
DNA methyltransferase (cytosine-5) 1	Dnmt1	<a href="#">NM_010066.3</a>	4193	87..4946
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	Dnajb6	<a href="#">NM_011847.3</a>	658	204..932
dual specificity phosphatase 14	Dusp14	<a href="#">NM_019819.3</a>	589	275..871

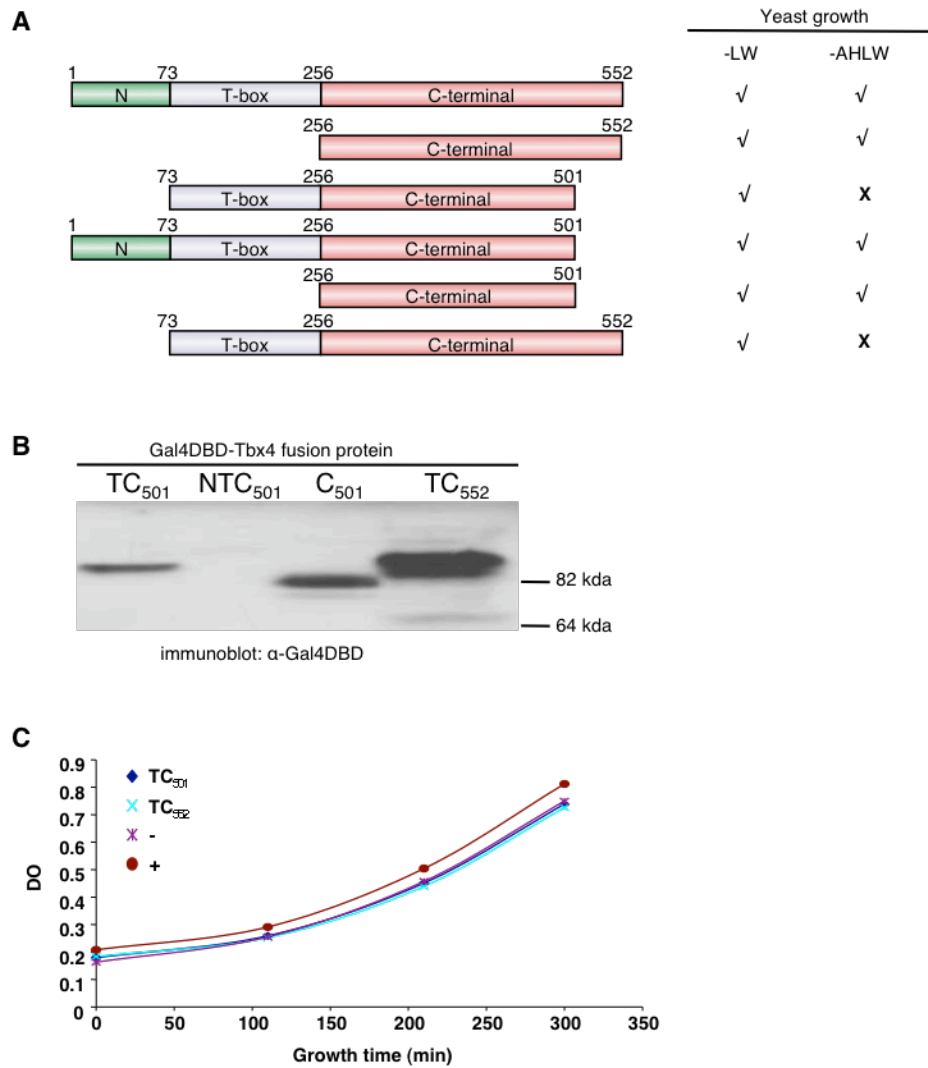
elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	Eftud2	<a href="#">NM_011431.2</a>	2222	28..2943
elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	Eftud2	<a href="#">NM_011431.2</a>	2458	28..2943
F-box and WD-40 domain protein 5	Fbxw5	<a href="#">NM_013908.3</a>	1990	133..1854
fibulin 2	Fbln2	<a href="#">NM_007992.2</a>	3191	151..3816
growth differentiation factor 10	Gdf10	<a href="#">NM_145741.2</a>	1423	310..1740
guanine nucleotide binding protein, beta 1	Gnb1	<a href="#">NM_008142.3</a>	509	4..1026
H19 fetal liver	H19	<a href="#">NR_001592.1</a>	2031	1..2615
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HnrpF		758	
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	Hnrph1	<a href="#">NM_021510.2</a>	580	125..1474
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	Hnrph2	<a href="#">NM_019868.2</a>	597	
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	Hnrpk	<a href="#">NM_025279.2</a>	425	152..1543
insulin-like growth factor binding protein 5	Igfbp5	<a href="#">NM_010518.2</a>	5089	727..1542
kinesin family member 21A	Kif21a	<a href="#">NM_016705.2</a>	4244	1..4898
LIM domain only 2	Lmo2	<a href="#">NM_008505</a>	489	240..926
lysyl oxidase	Lox	<a href="#">NM_010728.1</a>	1119	375..1610
mesoderm specific transcript	Mest	<a href="#">NM_008590</a>		248..1255
mitochondrial ribosomal protein S18B	Mrps18b	<a href="#">NM_025878.1</a>	1	7..771
N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase, gamma subunit	Gnptg	<a href="#">NM_172529.3</a>	75	6..929
nitrilase family, member 2	Nit2	<a href="#">NM_023175.1</a>	118	46..876
non-POU-domain-containing, octamer binding protein	Nono	<a href="#">NM_023144.1</a>	582	129..1550
nucleoporin 43	Nup43	<a href="#">NM_145706.1</a>	153	800..1189
nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	Nudt21	<a href="#">NM_026623.3</a>	139	148..831
programmed cell death 2	Pdcd2	<a href="#">NM_008799.2</a>	323	29..1060
protein arginine N-methyltransferase 7	Prmt7	<a href="#">NM_145404.1</a>	1742	131..2209
protein O-fucosyltransferase 1	Pofut1	<a href="#">NM_080463.3</a>	371	56..1237



protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform	Ppp2cb	<a href="#">NM_017374.3</a>	339	297..1226
pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Pdhb	<a href="#">NM_024221.3</a>	374	61..1140
regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2	Rcbtb2	<a href="#">NM_134083.3</a>	1054	244..1899
retinoblastoma binding protein 4	Rbbp4	<a href="#">NM_009030.3</a>	825	138..1415
ribonuclease T2B	Rnaset2b	<a href="#">NM_026611.2</a>	229	139..918
ribosomal protein S9	Rps9	<a href="#">NM_029767.2</a>	17	50..634
RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog	Rmi1	<a href="#">NM_028904.2</a>	341	206..2056
RNA binding motif protein 39	Rbm39	<a href="#">NM_133242.2</a>	1253	368..1960
RNA binding motif protein 4	Rbm4	<a href="#">NM_009032.2</a>	491	218..1303
RNA binding motif protein 9	Rbm9	<a href="#">NM_053104.4</a>	1355	386..1735
RNA binding protein gene with multiple splicing	Rbpms	<a href="#">NM_001042675.1</a>	426	301..963
sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain	Sema5a	<a href="#">NM_009154.2</a>	1151	659..3883
seven in absentia 1A	Siah1a	<a href="#">NM_009172.1</a>	511	121..969
similar to reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	Reck	<a href="#">NM_016678.</a>	61	77..2140
SIVA1, apoptosis-inducing factor	Siva1	<a href="#">NM_013929.1</a>	133	88..615
suppressor of var1, 3-like 1	Supv3l1	<a href="#">NM_181423.2</a>	1602	9..2348
sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	Svep1	<a href="#">NM_022814.2</a>		221..10924
thyroid hormone receptor interactor 6	Trip6	<a href="#">NM_011639.3</a>	834	174..1616

transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	Tgfb1i1	<a href="#">NM_009365.2</a>	1771	1345..2679
tripartite motif-containing 44	Trim44	<a href="#">NM_020267.2</a>	3690	217..1254
WD repeat domain 26	Wdr26	<a href="#">NM_145514.3</a>	1362	315..1859
X-prolyl aminopeptidase	Xpnpep1	<a href="#">NM_133216.2</a>	1530	127..1998
XRCC6 binding protein 1	Xrcc6bp1	<a href="#">NM_026858.2</a>	208	67..672
zinc finger CCCH type containing 7B	Zc3h7b	<a href="#">NM_001081016.1</a>	4923	1..5958

**Supplementary Table 3.2**



**Supplementary Figure 3.1 Characteristics of the Tbx4-expressing yeasts used for the two-hybrid screen.**

## **CHAPITRE 4**

Ce chapitre concerne un travail fait en collaboration dans le laboratoire avec Dr Vincent Coulon et Dre Aurore L'honoré sur le rôle des facteurs Pitx dans la différenciation musculaire, en particulier dans ce chapitre sur l'identification d'un promoteur alternatif de Pitx3, ciblant son expression dans les cellules musculaires. Ma contribution a permis de réaliser la figure 1a-d, la figure 3 et la figure 7. J'ai aussi été impliqué dans l'écriture du manuscrit. Ce chapitre est un aparté du sujet central de cette thèse. Il est par contre inclus, car il touche à une thématique très rapprochée, soit la régulation d'un facteur de transcription qui est impliqué dans les étapes précoces de la détermination du sort cellulaire myogénique (L'honoré, Ouimette, Lavertu Jolin, Drouin (2010) *Development*, Annexe 2). Par ailleurs, j'ai aussi contribué au manuscrit cité dans le chapitre 4 (p153; Balsalobre, Ouimette, Poulin, Drouin, en préparation) où nous avons identifié que les facteurs Pitx2 et Pitx3 étaient impliqués dans la régulation des gènes de différenciation myogéniques, dont la myogénine, en transfection transitoire, en immunoprécipitation de la chromatine et à l'aide de transgéniques transitoires. C'est donc un projet que j'ai suivi et dans lequel je me suis impliqué activement au cours de ma thèse. Ce manuscrit a été publié en primeur le 9 novembre 2005 dans la revue *Journal of Biological Chemistry* (282 (45); 33192-200) (doi:10.1074/jbc.M706119200) (Copyright American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

**Chapitre 4: A MUSCLE-SPECIFIC PROMOTER DIRECTS *PITX3* GENE  
EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE CELLS**

**Vincent Coulon<sup>1,2,\*</sup>, Aurore L'Honoré<sup>1\*</sup>, Jean-François Ouimette<sup>1,\*</sup>, Émilie Dumontier<sup>1</sup>, Pepijn van den Munckhof<sup>1,3</sup>, Jacques Drouin<sup>1‡</sup>**

\*These authors contributed equally to the work

<sup>1</sup>Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal QC Canada H2W 1R7

<sup>2</sup>CNRS UMR 5535, Institut de génétique moléculaire, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 05 France

<sup>3</sup>Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Meibergdreef 9, Posthus 22660, 1100DD Amsterdam, The Netherlands

Running title: Muscle-Specific Pitx3 Promoter and Expression

Keywords : myogenesis, MyoD, transcription, differentiation, transgenic mice

‡Address correspondence to: Jacques Drouin, Laboratoire de génétique moléculaire, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), 110, avenue des Pins Ouest, Montréal QC Canada H2W 1R7;

Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575

#### 4.1 ABSTRACT

The *Pitx* homeobox transcription factor genes have been implicated in different developmental processes, including determination of hindlimb identity for *Pitx1*, left-right asymmetry for *Pitx2*, and eye development and survival of midbrain dopaminergic neurons for *Pitx3*. *Pitx1* and *Pitx2* have partly redundant activities in craniofacial development, including in pituitary organogenesis as indicated by their names. These genes also exhibit redundant activities in the control of hindlimb bud growth. Recent studies have shown expression of the three *Pitx* genes in muscle, with *Pitx3* being the most widely expressed in all skeletal muscles. We now report the identification of a muscle-specific promoter within the *Pitx3* gene that is situated between the first exon for eye and brain expression and exon 2 that contains the initiator ATG codon. Sequences proximal to this muscle specific exon 1 are essential and sufficient to confer muscle-specific expression in transgenic mice, they are responsive to myogenic bHLH regulatory factors (MRFs) and they recruit these factors *in vivo*. In agreement with exclusive use of the muscle-specific promoter in *aphakia* mice that are deleted of the brain promoter, the histone H3K4me3 promoter signature shifts to this promoter in e13 *ak* limb bud muscle cells. MRF activation of *Pitx3* transcription may be part of a positive feedback loop contributing to establishment of the myogenic program.

## 4.2 INTRODUCTION

The *Pitx* genes play critical roles in early development of several tissues and organs. The first of these homeobox transcription factors, *Pitx1* (*Ptx1*), was discovered for its role in cell-specific transcription of the pituitary POMC gene (1); on the POMC gene, it acts as an obligate partner of the highly cell-restricted Tbox transcription factor, *Tpit* (2; 3). Beyond their role in pituitary organogenesis and transcription as implied by their names (4; 5), the *Pitx* genes play several roles in early development. Indeed, *Pitx1* is first expressed in the lateral plate mesoderm (lpm) of the posterior half of the embryo, starting as soon as posterior lpm is formed at gastrulation (6). Throughout later development, *Pitx1* remains highly expressed in developing hindlimb bud mesenchyme and was shown to determine hindlimb identity in mouse (7; 8), chick (9; 10) and fish (11). In addition, *Pitx1* controls the growth ability of hindlimb mesenchyme together with *Pitx2* (12). *Pitx2* is also expressed in the lpm but preferentially on the left side where its left-specific expression is controlled by Sonic hedgehog (Shh) and/or nodal (13). The left-specific *Pitx2c* isoform uses a different promoter than for its bilateral expression in other tissues (14). This alternate promoter is responsible for production of *Pitx2a* and *Pitx2b* that arise through differential splicing of exon 2 (4). Left-specific expression is critical for left-asymmetry and development of the lungs, heart and stomach (14; 15). In the heart, the left-specific isoform of *Pitx2*, *Pitx2c*, has activities that are specific or redundant with those of the bilaterally expressed isoforms *Pitx2a* and *Pitx2b* (16). Finally, the third gene of



the family, *Pitx3*, is expressed in the eye (17) and midbrain dopaminergic neurons (18). In agreement with this expression, a natural mouse mutant of the *Pitx3* gene promoter, the *aphakia* (*ak*) mouse, has lens developmental defect (17), and in humans, *Pitx3* mutations have been associated with eye dysmorphogenesis (anterior segment mesenchymal dysgenesis) and with congenital cataracts (19). The *ak* mouse was also found to exhibit a severe deficit of dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area (20-22) and to have an akinetic phenotype similar to the loss of motor movement presented by patients with Parkinson's disease (22). Similar to Parkinson patients, this mouse model exhibits a locomotor response to L-dopa injection (23). Early reports on expression profiles of *Pitx* genes had noted expression of *Pitx1* in a small subset of muscles (6), of *Pitx2* in early myoblasts (24) and of *Pitx3* in extraocular muscles, tongue and head muscles [(19) and our unpublished results]. Muscle expression of these genes was not studied systematically until recently as we conducted a detailed analysis of their expression patterns in early precursors and in developing muscle (25). It thus appears that *Pitx3* is expressed in all skeletal muscles. Since *Pitx3* is the only member of the family to be expressed in all muscles, we have undertaken to define the mechanism of its expression and its role in muscle development. Since a natural mouse mutant of the *Pitx3* gene already exists, the *ak* mouse, we assessed muscle expression of *Pitx3* in *ak* mice and found it to be normal. The present report delineates a novel muscle-specific promoter within intron 1 of the *Pitx3* gene that is not affected by the *ak* mutation. Further, we defined

the muscle-specific *Pitx3* promoter in transgenic mice experiments and showed that it is adequate to target gene expression in early skeletal muscle, thus mimicking expression of the endogenous gene. In normal muscle, both brain and muscle initiation sites appear to be used but only muscle-specific exon 1m is transcribed in *ak* mice, in agreement with a shift of the histone H3K4me3 promoter signature in *ak* muscle cells. Finally, we show that *Pitx3* expression is stimulated by myogenic bHLH regulatory factors (MRFs) in a positive feedback regulatory mechanism that serves to establish the myogenic program of differentiation.

### **4.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES**

#### **Wholemout in situ hybridization**

The protocol used is from Dr Janet Rossant's laboratory at (<http://www.sickkids.ca/rossant/custom/protocols.asp>). A rat Pitx3 cDNA EcoRI-BamHI fragment encompassing the entire translated sequence was used as probe.

#### **LacZ staining and immunohistochemistry**

For  $\beta$ Galactosidase ( $\beta$ Gal) staining, 12.5 dpc mouse embryos were fixed 25 min in 4% paraformaldehyde at 4°C, rinsed in cold PBS 0.01% Na deoxycholate, 0.02% NP-40 then incubated 24 h at 30°C (to minimize endogenous activity) in staining solution (0.4 mg/ml X-Gal, 4 mM potassium ferricyanate, 4 mM potassium ferrocyanate, 4 mM MgCl<sub>2</sub>). Immunohistochemistry was performed as described (26) with the following antibodies: anti-Pitx3 polyclonal antibody was described (22), anti-MyoD monoclonal antibody was purchased from Pharmingen.

#### **RNA analyses**

Total RNA was prepared from adult mouse muscle, spleen or e14.5 embryos with TRIZOL (Invitrogen) according to manufacturer's directions. Purification of mRNA was performed using QIAGEN Oligotex Maxi Kit following the supplier's protocol. For RT-PCR, reverse transcription was

performed with 500 ng mRNA using a reverse oligonucleotide primer in Pitx3 3'UTR (TCACAGCCTCTCCGGACAGG), and the resultant cDNA was purified on Qiaquick columns (QIAGEN), diluted 100-fold and amplified with the following primers: reverse primer Rev/cDNA (GGAGTGCCTGCGTCCGATAA) with either oligonucleotide #1 (CTCTGGGAGCTCATAGCTTG), #2 (GTGTGTGGCTGCACATGTGT), #3 (GTGTTTGTGCCTTTGGCTTC), #4 (GGGAGCGCATGTGTGAGAGA), #5 (TGTCAGAGAGAGACAGAGGAGACT), #6 (AGGGG AATGGCTAGCTCCAAA), #7 (GGACTGAGAGAGCTGAGGTT), #8 (CCCCACACAGAGTTCTGAA) or 1,b (ACAGCCACCACCCGGAGTCT). Control reactions on 400 ng genomic DNA were done with primers #4-8 with reverse primer Rev/gDNA (CAAGCTATGAGCTCCCAGAG). PCR products were separated on a 1.6% agarose gel. For mRNA quantitation, reverse transcription aliquots prepared as above from *ak* and wt e14.5 limb bud mRNA were analyzed by quantitative real-time PCR (MX-3005, Stratagene, La Jolla CA). The primers used were oligonucleotides 1,b and #4 with Rev/cDNA for exon 1l and exon 1m, respectively. Relative abundance is calculated by comparison to  $\beta$ -actin mRNA amplified with the following primers: TGATGGTGGGAATGGGTCAGAA and TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAA.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**

Chromatin immunoprecipitations were performed as described (27) with modifications. Intact limb buds from e13 wild-type or *ak* embryos were collected in PBS and formaldehyde (final concentration 1%). After 5 min agitation, homogenization was performed with Dounce potter A for 10 min in crosslinking solution. Glycine (final concentration 125 mM) was added to quench excess formaldehyde. Pellets collected by centrifugation (1000 g, 3min) were washed twice with PBS and resuspended in Triton buffer (0.25% Triton X-100 10 mM Tris pH8, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, PMSF 0.1mM, pepstatin 1µg/ml) and homogenized with Dounce potter B. Nuclei pellets were then resuspended in NaCl buffer (NaCl 200 mM, 10 mM Tris pH8, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, PMSF 0.1mM, pepstatin 1 µg/ml). After centrifugation, cells were resuspended in sonication buffer (0.5% SDS, 0.5% Triton X- 100, 0.05% NaDOC, 10 mM Tris pH8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, PMSF 0.1mM, pepstatin 1 µg/ml) and sonicated to obtain DNA fragment of about 0.5-2 kb. 500 µg of sonicated chromatin was subjected to immunoprecipitation at 4oC with 5 µg of antibodies against myoD (PharMingen), myogenin (PharMingen), trimethyl-lysine 4 histone 3 (Abcam), RNA polymerase II (Santa Cruz) or matched rabbit nonimmune IgG (Sigma) as negative control. Immunoprecipitates were collected with protein A/G agarose beads (Upstate Biotechnology) saturated with tRNA. Beads were washed 6 times with the following buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,

0.5 mM EGTA, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, PMSF 0.1mM, pepstatin 1µg/ml). Chromatin was eluted from beads with elution buffer (1% SDS, 50 mM Tris pH8, 10 mM EDTA) and purified with QiaQuick purification kit (QIAGEN). Quantitative real-time PCR (MX-3005, Stratagene, La Jolla, CA) was performed with the SYBR Green kit (QIAGEN, Valencia, CA). For ChIP analyses of the *Pitx3* locus, the following primers (pictured in Fig. 4.7A) were used:

A: ACAGACAGCGACAAGTGGAGAA with ATCAGAAGCGTTTGCCATCCAC; B: AGTAGCTCATGCTTTCCTTCCCAG with CAAGCGTTCTATCCGTTCCAAACC; C: AGCTCAGTTTGCAGAGTGCTTG with ATAGCACGAGGCCTCACTTACA; D: TGTCAGAGAGAGACAGAGGAGACT with CTTAGACACAGCAAGCACTTGGAC; E: TGATTCAGACTTGCGGTTGAGC with TAGCTGGTCACACCAAGCTTCA. Enrichments were calculated relative to PCR analyses (primers TCGGAGTGGAATTACCTATGTGCG with TGGTTTCACAAGATATCACACTTTCCC) of a control sequence within the POMC gene promoter that is not expressed in muscles.

### **Transgene constructs**

Mouse *Pitx3* gene sequences were cloned from a genomic 129/sv lambda DASH2 phage library (1). A genomic 4 kb *Pitx3* promoter fragment was inserted upstream of LacZ [from alpha-GSU-LacZ (28)] to create transgene F. Addition of the 3' two thirds of *Pitx3* intron 1 yielded transgene D. Transgene E was obtained by deleting the 2.2 kb putative alternative promoter

region in D. For A and B transgenes, the *Pitx3* 4 kb promoter in transgene F was replaced by an intronic fragment corresponding to the conserved promoter region (corresponding to -1775/+12 of the muscle promoter) with or without a less conserved 1.5 kb upstream region, respectively. Insertion of the 3 kb 5' part of intron1 into transgene B yielded transgene C. All constructs were checked by restriction and sequencing; maps and sequences are available upon request.

### **Transgenic mice**

All DNA fragments for micro-injection were produced by SacII-Sall digestion and purified on agarose gel. Transgenic mice were produced as previously described (29). For transient transgenics, foster mice were sacrificed at 12.5 dpc, taking the day of injection as 0.5 dpc.

### **Cell culture and transfection**

L6 and C2C12 cells were cultured in DMEM containing 20% fetal bovine serum, and transfected in DMEM without serum for 4 h with lipofectamine according to manufacturer's directions. Usually, for 35 mm wells, 1  $\mu$ g  $\beta$ Gal reporter was used per well. For differentiation, cells were grown to confluence, then medium was changed to DMEM containing 2% horse serum and cells were maintained in culture for 24 or 48 h. In experiments to assess responsiveness to MyoD, expression vectors for both MyoD and E47 (same amount for each) were co-transfected with reporter and reporter activity was

measured 24 h post-transfection in proliferation conditions.  $\beta$ Gal activity was assayed in lysates with a luminometer using the Galacto-Light system (TROPIX) as described by the manufacturer or by cytochemistry using X-Gal as a substrate in formaldehyde-fixed cells to correlate activity with differentiated morphology.

### **Software**

Sequence alignments were performed using CLUSTAL (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), graphic genomic alignments with LAGAN ([http://lagan.stanford.edu/lagan\\_web/index.shtml](http://lagan.stanford.edu/lagan_web/index.shtml)) and VISTA (<http://pipeline.lbl.gov/cgi-bin/gateway2>). The promoter prediction software is also available online ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)).



## 4.4 RESULTS

### **Pitx3 is expressed in developing muscles of aphakia mice**

In order to establish expression of *Pitx3* in developing muscles, we used wholemount in situ hybridization with mouse embryos at day 12.5 (e12.5) of development. This analysis revealed expression of *Pitx3* in myotomes and developing muscle masses of the limbs (Fig. 4.1A, B). Muscle masses of both forelimb and hindlimb buds express *Pitx3*, and expression is also observed in forming abdominal muscle masses. It thus appears that *Pitx3* is very widely expressed in most developing skeletal muscles. We provided a detailed investigation of this expression profile elsewhere (25). Since the *ak* mouse was shown to be a promoter mutant of the *Pitx3* locus (30; 31), we wanted to verify a putative defect of *Pitx3* expression in muscle. Surprisingly, we found that muscle expression of *Pitx3* is intact in *ak* embryos and that in this tissue, it appears undistinguishable from wild-type littermates (Fig. 4.1C, D). In order to verify that Pitx3 protein indeed has normal expression in *ak* muscles and further that it is expressed in adult muscle, we performed Western blot analyses of hindlimb muscles using an antibody specific for Pitx3. This analysis revealed a similar band in both wild-type and *ak* mice at about 38 kDa (Fig. 4.1E).

### **A muscle-specific *Pitx3* exon 1**

Since the *ak* deletion removes the brain and eye (lens) exon 1 and the upstream region of the previously described *Pitx3* gene (31), we reasoned that a different exon 1 and promoter might be active in muscles and that this putative muscle exon 1 could be spliced onto a common exon 2. The quest for an alternate initiation site for muscle *Pitx3* expression was facilitated by the search of genome databases for EST containing *Pitx3* sequences. Indeed, a BLAT search on the UCSC genome server identified a rat EST (BF543032) matching with exons 2 and 3 of *Pitx3* but containing different exon 1 sequences (thereafter called exon 1m for muscle) by comparison to the already known exon 1 (thereafter called exon 1l,b for lens, brain expression). The structure of the *Pitx3* mouse locus is schematically represented in Figure 4.2A showing the position of both exon 1l,b and the novel putative exon 1m; the figure also shows the position of the two genomic deletions identified in *ak* mice (30; 31). It is interesting to note that putative exon 1m lies within a region of similar sequence conservation as those of exons 1l,b, 2, 3 and 4 (Fig. 4.2B). In order to pinpoint a putative transcription start site for exon 1m, the BDGP neural network promoter prediction software (32) was used to predict putative initiation site(s) as indicated in Figure 4.3A; this prediction was made with a high score (0.83, where maximum is 1). This putative start site lies within a region of high sequence conservation between mouse, rat and human sequences (Fig. 4.3A). In order to validate this prediction, a series of RT-PCR reactions were carried out using e14.5 embryo mRNA and different primers. A

common 3' primer located in exon 2 was used in all cases and different 5'primers (Fig. 4.3A) located downstream of putative initiation (#5, 4, 3, 2, 1) or just upstream of this predicted start site (#6, 7, 8) were used. No RT-PCR products could be amplified using adult spleen RNA as control (data not shown), and a PCR product of the expected size was obtained with primer #5 located between putative nucleotides -6 and +18 (Fig. 4.3B). In contrast, no PCR product could be obtained with primer #6 which lies at positions -45 to -26 bp relative to the putative start site (Fig. 4.3B). In order to verify that primer #6 was active in PCR, control reactions were conducted using genomic DNA substrate: a fragment of the expected size was obtained (Fig. 4.3C). DNA sequencing of the RTPCR products confirmed that this fragment contains the expected exon 1m, exon 2, and exon 3 sequences as predicted for the proposed muscle mRNA shown in Figure 4.2A. Similar results were obtained with other forward primers. It is noteworthy that the initiator ATG codon is found in exon 2 of the *Pitx3* gene: it is therefore predicted that the Pitx3 protein should be the same in muscle as in eye and midbrain. These data suggest that muscle expression of *Pitx3* is driven by a different promoter than the one used in eye lens and brain but this activity may still use the exon 1l,b initiation site. Indeed, using RTPCR with a forward primer in exon 1l,b and the exon 2 reverse primer, it was found that the exon 1l,b is also used in muscle together with exon 1m (Fig. 4.3B). In order to assess the relative use of each first exon in muscle, RT-QPCR was performed (Fig. 4.3D). This analysis revealed about 8 times more exon 1l,b-containing mRNA compared to exon

1m. In agreement with the deletion of exon 1l,b in *ak* mice, no PCR product corresponding to exon 1l,b sequences were detected in *ak* muscle but the relative abundance of exon 1m in these tissues was increased about 2.8 fold compared to wild-type muscle (Fig. 4.3D).

### **A muscle cell-specific Pitx3 gene promoter**

In order to test whether the putative *Pitx3* promoters are active *in vivo* and show the expected specificity, we tested the two predicted promoter sequences of the *Pitx3* locus in transgenic mice. The promoter fragments were fused to  $\beta$ Gal (*lacZ*) coding sequences and founder e12.5 transgenic embryos were assessed for transgene expression using *lacZ* activity as reporter. A 4 kb promoter fragment for exon 1l,b that is expressed in eye lens and midbrain (mb) was found to be largely inactive in transgenic embryos (Fig. 4.4, construct F). This transgene did not exhibit any expression in lens or midbrain, and only weak expression in the myotome region of only one embryo. In contrast, four of seven embryos had faint ectopic expression at unrelated sites. Stable mouse transgenic lines had been established with the same transgene previously, and they showed similar weak and inconsistent patterns of expression. Various putative promoter fragments for exon 1m were also assessed in transgenic mice and the most consistent and strongest expression was observed with the shortest transgenic promoter fragment (construct A). This 1.6 kb promoter fragment contains two regions of high

sequence conservation: a promoter-proximal region of about 350 bp and another upstream region of about 300 bp at -1450 bp (Fig. 4.2B). This transgene directed very strong expression in myotomes, limb and facial muscles with very infrequent ectopic expression (Fig. 4.4, construct A); LacZ activity was never detected in midbrain or eye lens. The addition of more upstream sequences (constructs B, C) did not further enhance muscle expression of transgenes: in fact, expression was weaker (Fig. 4.4) with particular loss of expression at the level of craniofacial muscles, of the epaxial domain of the myotome, and of the most caudal somites (beyond the hindlimb level). In fact, transgene expression in face muscles was only consistently observed for construct A: 9/11 founders had facial expression, compared to 3/9 for construct B and 4/17 for construct C. A short region of unconserved upstream sequences (absent in construct C) could not be tested in transgenic mice because the presence of these sequences rendered plasmids very unstable. Since construct F conferred expression at low frequency (1/7) in putative myogenic cells, we wanted to test whether these sequences may act in concert with the musclespecific promoter and whether the muscle-specific sequences could act as enhancers. A transgene containing both promoters (construct D) exhibits similar muscle specificity as constructs B or C; it is also less active than construct A. In agreement with the hypothesis that the highly conserved sequences around exon 1m (Fig. 4.2B) that are active in construct A are important for muscle-specific activity, it was observed that deletion of those sequences completely abolished transgenic promoter activity (Fig. 4.4,

construct E). Collectively, these data clearly identify a muscle-specific promoter/enhancer upstream of exon 1m of the *Pitx3* gene, and indicate that this promoter is necessary and sufficient for muscle-specific expression of *Pitx3*. The maintenance of *Pitx3* expression in *ak* muscles is completely consistent with the existence of separate regulatory sequences for muscle-specific expression of the gene.

### **The *Pitx3* muscle-specific promoter is active in myoblasts and in differentiating muscle cells**

The early pattern of muscle expression for transgene A (Fig. 4.5A, B) is extremely similar to the pattern of *Pitx3* mRNA expression (Fig. 4.1). It includes forming skeletal muscle masses of limbs, as revealed by analysis of tissue sections from XGal- stained embryos (Fig. 4.5C, D). In order to ascertain the muscle-specificity of this LacZ activity, we performed co-labelling by immunohistochemistry with *Pitx3* or *MyoD*. This demonstrated co-expression of *MyoD* with LacZ in developing FL muscle masses (Fig. 4.5E, F) and in the myotome (Fig. 4.5G, H). A similar distribution was observed for *Pitx3* and LacZ (Fig. 4.5I, J). Only a subset of *MyoD*-positive cells stain for LacZ in both myotome and limb muscles; in more caudal myotomes (Fig. 4.5I), LacZ-positive cells are also less abundant than *Pitx3*-positive cells (Fig. 4.5J), suggesting a delay between endogenous *Pitx3* and transgene A LacZ activity.

These data clearly indicate that the muscle-specific exon 1m promoter of the *Pitx3* gene is only active in muscle cells.

### **Myogenic bHLH regulatory factors activate the *Pitx3* muscle promoter**

In order to further define the *Pitx3* muscle promoter, we used transfection of promoter constructs into muscle cell lines. Initially, we tested the activity of the -1597 bp *Pitx3* promoter (construct A) fused to LacZ in proliferating C2C12 cells and we observed very low  $\beta$ Gal activity (Fig. 4.6A). However, significant activity was observed with the same reporter in C2C12 cells following 24 h in differentiation conditions (33). In agreement with this promoter/reporter activation, endogenous *Pitx3* mRNA levels were found to increase in similar differentiation relative to proliferation conditions (Fig. 4.6B). We then assessed the effect of MyoD on the -1597 bp *Pitx3* promoter using L6 cells, another muscle-derived cell line; similar results were obtained in C2C12 cells (data not shown). This experiment clearly indicated that MyoD can activate the *Pitx3* muscle promoter (Fig. 4.6C). We then localized MRF-responsive sequences using deletions of the -1597 bp reporter plasmid. Thus, deletion to -590 bp (Del B) completely prevented responsiveness to MyoD (Fig. 4.6C). In contrast, deletion to -1388 bp (Del A) did not affect the responsiveness to MyoD, suggesting that active sequences are present between -1388 and -590 bp (Fig. 4.6C). Interestingly, numerous muscle-specific E-boxes that are the targets of MRFs are present in this interval and

the recruitment of MyoD to the *Pitx3* locus was recently shown using a ChIP-on-chip strategy (34) in agreement with the present data showing activation of the *Pitx3* promoter. The differentiation of C2C12 cells is accompanied by upregulation of MyoD activity, and in agreement with the deletion analyses (Fig. 4.6C), we found that the different deletion mutants of the *Pitx3* promoter exhibit similar activity when assessed upon differentiation of C2C12 cells, with the -590 bp promoter (Del B) showing no activity (Fig. 4.6D). Collectively, these data are in agreement with the expression of *Pitx3* in differentiating muscle cells (25) and with a scheme in which *Pitx3* expression is subject to positive feedback upregulation by MyoD during muscle cells differentiation.

### **Chromatin signature of muscle-specific promoter**

The action of MyoD on the *Pitx3* muscle regulatory sequences appeared to depend principally on sequences between -1388 and -590; this 702 bp region contains multiple putative MRF binding sites and we developed a PCR strategy to investigate MRF recruitment to this region by ChIP (Fig. 4.7A). We found significant recruitment of both MyoD and myogenin to this region (Fig. 4.7B, primers C) compared to the exon 1l,b regulatory region (primers A) or to exon 4 of the gene (primers E). It appears that both promoters 1l,b and 1m are active in muscle (Fig. 4.3D) although only promoter 1m was active in transgenics (Fig. 4.4). In order to validate this at the chromatin level, we used ChIP against tri-methyl-lysine 4 histone H3



(H3K4me3) that has been reported to be a signature for active promoters (35;36). This analysis (Fig. 4.7C) revealed a higher level of H3K4me3 at the exon 1l,b promoter (primers B) than at exon 1m (primers D) but the level of H3K4me3 at exon 1m H3K4me3 was significantly increased in *ak* mice and was absent from the exon 1l,b region when probed with primers B (Fig. 4.7A) that are beyond the deletion end point in the *ak* genome. Although not different in wt and *ak* limb buds, the levels of H3K4me3 at exon 4 are unusually high for transcribed sequences: it is possible that this region may contain another promoter, possibly for antisens transcripts (37). In agreement with the levels of H3K4me3 and with relative promoter usage in muscle (Fig. 4.3D), more RNA Pol II was found to be present at exon 1l,b than exon 1m in muscle (Fig. 4.7D) but this ratio was reversed in *ak* muscles. Collectively, these data indicate that both promoters 1l,b and 1m are used in muscle cells but that the muscle regulatory sequences are primarily situated upstream of exon 1m.

## 4.5 DISCUSSION

The present report defines a skeletal muscle-specific transcription unit of the *Pitx3* gene. This gene was previously known to be expressed in the eye lens and in a subset of dopaminergic neurons of the midbrain through the activity of a common promoter and exon 1. The present report defines a new promoter located between the eye/midbrain promoter and the ATG-containing exon 2. The muscle-specific *Pitx3* promoter appears to be entirely contained within a 1.6 kb DNA fragment that mimics in transgenic mice the expression of endogenous *Pitx3* in muscles. The muscle-specific *Pitx3* promoter can be activated by the myogenic bHLH regulatory factor, MyoD. The action of MRFs on the *Pitx3* promoter is consistent with the expression pattern of *Pitx3* during muscle development.

### **A muscle-specific promoter and exon of the *Pitx3* locus**

The skeletal muscle-specific *Pitx3* transcription unit defined in the present work includes a new exon 1 (exon 1m) and important regulatory sequences located within 1659 bp upstream (Fig. 4.4-4.7). Transgenic mice analyses of this muscle-specific promoter suggest that it is entirely sufficient for muscle expression (Fig. 4.4). The activity of the exon 1m promoter in transgenic mice is entirely consistent with the expression in developing myotomes of a GFP knock-in allele of the *Pitx3* gene (38). The muscle-specific activity of exon 1m regulatory sequences in transgenic mice contrasts with its partial usage in normal muscle. Indeed, all criteria (mRNA abundance, RNA

Pol II recruitment and H3K4me3 enrichment) indicate that exon 1l,b is used preferentially even under the influence of muscle regulatory sequences. It is only upon deletion of exon 1l,b in *ak* mice that this initiation is no longer used in favor of exon 1m (Fig. 4.3D) and that H3K4me3 enrichment at exon 1l,b is lost (Fig. 4.7C). Exon 1l,b appears to have strong transcription initiation capacity: it is used in brain and eye but regulatory sequences directing this activity have not yet been identified and are not within the upstream 4 kb (Fig. 4.4, transgene F). The muscle regulatory sequences (between -1388 and -590 bp) that are 6 kb downstream from exon 1l,b appear to preferentially use this initiation relative to exon 1m initiation that is closer. The mechanism for promoter selection in such case remains poorly understood.

### **Role of Pitx transcription factors in the program of muscle gene expression**

The onset of *Pitx3* expression with differentiation of Pitx2- positive progenitors (25) is consistent with the activity of the *Pitx3* exon 1m shown in transgenic mice (Fig. 4.4 and 4.5). In addition, the maintenance of Pitx2 expression in *Pitx3*<sup>-/-</sup> muscles suggests that at least one Pitx factor must be present for maintenance of the myogenic programs (25) and that *Pitx2* may contribute in part to activation of *Pitx3* expression. The earliest *Pitx* gene expressed during muscle cell differentiation is *Pitx2* with expression in proliferating muscle progenitors (24; 25; 39). This early expression is progressively replaced by *Pitx3* in differentiated and post-mitotic muscle cells

(25). *Pitx3* expression persists in adult skeletal muscles (Fig. 4.1E). Whereas MRFs expression precedes that of *Pitx2* in myotomes, it is the reverse in developing limb bud muscle masses with *Pitx3* expression following *Pitx2*, together with *MyoD* and cell differentiation (25). In this context, the present demonstration of an activation of the *Pitx3* exon 1m promoter by *MyoD* is likely to represent one mechanism responsible for activation of the *Pitx3* muscle-specific promoter. In addition, MRF activation of the *Pitx3* promoter may also contribute to a positive feedback loop by which MRFs and *Pitx3* reinforce the myogenic program. This positive auto-regulatory loop could operate both in myotome-derived and limb muscles. Direct synergism between *Pitx3* and MRFs may also serve a maintenance and amplification function for muscle-specific gene transcription. Indeed, this is consistent with the action of *Pitx3* on genes encoding muscle-specific proteins, including regulatory factors such as *MyoD* and myogenin and structural proteins like troponins (Balsalobre, Ouimette, Poulin, Drouin, in preparation). These genes are also targets of MRFs and synergistic activation of transcription is exerted on them by *Pitx3* and MRFs. Taken collectively, the data suggest that *Pitx* factors play essential roles in muscles to maintain the myogenic program of gene expression. The identification of muscle-specific regulatory sequences (Fig. 4.4) within the *Pitx3* locus as reported here is consistent with such role in muscle function.

#### 4.6 REFERENCES

1. Lamonerie, T., Tremblay, J. J., Lanctôt, C., Therrien, M., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1996) *Genes Dev.* **10**, 1284-1295
2. Lamolet, B., Pulichino, A. M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., and Drouin, J. (2001) *Cell* **104**, 849-859
3. Pulichino, A. M., Vallette-Kasic, S., Tsai, J. P. Y., Couture, C., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2003) *Genes Dev* **17**, 738-747
4. Gage, P. J., Suh, H., and Camper, S. A. (1999) *Mamm.Genome* **10**, 197-200
5. Tremblay, J. J., Goodyer, C. G., and Drouin, J. (2000) *Neuroendocrinol.* **71**, 277-286
6. Lanctôt, C., Lamolet, B., and Drouin, J. (1997) *Development* **124**, 2807-2817
7. Lanctôt, C., Moreau, A., Chamberland, M., Tremblay, M. L., and Drouin, J. (1999) *Development* **126**, 1805-1810
8. 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) *Genes Dev.* **13**, 484-494
9. Logan, M. and Tabin, C. J. (1999) *Science* **283**, 1736-1739

10. Tamaki, K., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Nakao, A., Sampath, K., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (1998) *J.Cell Physiol* **177**, 355-363
11. Shapiro, M. D., Marks, M. E., Peichel, C. L., Blackman, B. K., Nereng, K. S., Jonsson, B., Schluter, D., and Kingsley, D. M. (2004) *Nature* **428**, 717-723
12. Marcil, A., Dumontier, É., Chamberland, M., Camper, S. A., and Drouin, J. (2003) *Development* **130**, 45-55
13. Wright, C. V. (2001) *Dev.Cell* **1**, 179-186
14. Schweickert, A., Campione, M., Steinbeisser, H., and Blum, M. (2000) *Mech.Dev.* **90**, 41-51
15. Essner, J. J., Branford, W. W., Zhang, J., and Yost, H. J. (2000) *Development* **127**, 1081-1093
16. Liu, C., Liu, W., Palie, J., Lu, M. F., Brown, N. A., and Martin, J. F. (2002) *Development* **129**, 5081-5091
17. Semina, E. V., Reiter, R. S., and Murray, J. (1997) *Hum.Mol.Genet.* **6**, 2109-2116
18. Smidt, M. P., van Schaick, H. S., Lanctôt, C., Tremblay, J. J., Cox, J. J., van der Kleij, A. A., Wolterink, G., Drouin, J., and Burbach, J. P. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13305-13310

19. Semina, E. V., Ferrell, R. E., Mintz-Hittner, H. A., Bitoun, P., Alward, W. L. M., Reiter, R. S., Funkhauser, C., Daack-Hirsch, S., and Murray, J. C. (1998) *Nat. Genet.* **19**, 167-170
20. Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, R. M., Burke, R. E., and Goff, S. P. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **100**, 4245-4250
21. 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) *Development* **131**, 1145-1155
22. van den Munckhof, P., Luk, K. C., Sainte-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P. J., Sadikot, A. F., and Drouin, J. (2003) *Development* **130**, 2535-2542
23. van den Munckhof, P., Gilbert, F., Chamberland, M., Lévesque, D., and Drouin, J. (2006) *J.Neurochem.* **96**, 160-170
24. Logan, M., Pagán-Westphal, S. M., Smith, D. M., Paganessi, L., and Tabin, C. J. (1998) *Cell* **94**, 307-317
25. L'Honoré, A., Coulon, V., Marcil, A., Lebel, M., Lafrance-Vanasse, J., Gage, P. J., Camper, S. A., and Drouin, J. (2007) *Dev.Biol.* **307**, 421-433
26. Lanctôt, C., Gauthier, Y., and Drouin, J. (1999) *Endocrinology* **140**, 1416-1422
27. Forrester, W. C., Fernandez, L. A., and Grosschedl, R. (1999) *Genes Dev* **13**, 3003-3014

28. Kendall, S. K., Gordon, D. F., Birkmeier, T. S., Petrey, D., Sarapura, V. D., O'Shea, K. S., Wood, W. M., Lloyd, R. V., Ridgway, E. C., and Camper, S. A. (1994) *Mol.Endocrinol.* **8**, 1420-1433
29. Poulin, G., Lebel, M., Chamberland, M., Paradis, F. W., and Drouin, J. (2000) *Mol.Cell.Biol.* **20**, 4826-4837
30. Semina, E. V., Murray, J. C., Reiter, R., and Hrstka, R. F. G. J. (2000) *Hum.Mol.Genet.* **9**, 1575- 1585
31. Rieger, D. K., Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A., and Olsen, B. R. (2001) *Genomics* **72**, 61-72
32. Reese, M. G. (2001) *Comput.Chem* **26**, 51-56
33. Yaffe, D. and Saxel, O. (1977) *Nature* **270**, 725-727
34. Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sharan, R., Kluger, Y., and Dynlacht, B. D. (2005) *Genes Dev.* **19**, 553-569
35. Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004) *Nat.Cell Biol* **6**, 73-77
36. Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., and Ren, B. (2007) *Nat.Genet.* **39**, 311-318



37. Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E. S., and Bernstein, B. E. (2007) *Nature* **448**, 553-560

38. Zhao, S., Maxwell, S., Jimenez-Beristain, A., Vives, J., Kuehner, E., Zhao, J., O'Brien, C., de Felipe, C., Semina, E., and Li, M. (2004) *Eur.J Neurosci.* **19**, 1133-1140

39. Kioussi, C., Briata, P., Baek, S. H., Rose, D. W., Hamblet, N. S., Herman, T., Ohgi, K. A., Lin, C., Gleiberman, A., Wang, J., Brault, V., Ruiz-Lozano, P., Nguyen, H. D., Kemler, R., Glass, C. K., Wynshaw-Boris, A., and Rosenfeld, M. G. (2002) *Cell* **111**, 673-685

#### 4.7 FOOTNOTES

V. C. was supported by a fellowship from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, then by a Lavoisier fellowship from the French *Ministère des affaires étrangères*. A.L. was supported by the *Fondation pour la recherche médicale (FRM)*. Julien Lafrance-Vanasse provided cheerful help. We are grateful to R. Germinario for the gift of L6 cells and to Annie Vallée for her excellent expertise in paraffin- and cryo-sectioning. We thank Qin Zhang Zhu and Michel Robillard of IRCM Transgenic Facility for production of transgenic mice. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

#### 4.8 FIGURE LEGENDS

**Figure 4.1. *Pitx3* is expressed in myotome and developing skeletal muscles of *ak* mutant mice that carry deletions in the *Pitx3* locus.**

Wholemound *in situ* hybridization revealed with *Pitx3* cDNA probe in mouse embryos of 12.5 days of development (e12.5). Wild-type embryos (A, B) and *aphakia* (*ak*) mutant embryos (C, D) are shown. Note *Pitx3* staining in elongating myotome (A, C) as well as in developing muscle masses of the limb buds. The pattern of *Pitx3* expression in *ak* embryos (C, D) is indistinguishable from wild-type embryos. E) Western blot analysis of nuclear proteins from mouse hindlimb muscle of *ak* (lane 1) and wild-type (lane 2) mice revealed with *Pitx3*-specific antibody. A non-specific (ns) band is present in muscle extracts as well as in *Pitx1*-positive but *Pitx3*-negative AtT-20 cells (lane 3). The same *Pitx3* antibody was used for immunohistochemical analysis of the *Pitx3* expression profile (25).

**Figure 4.2. Structure of the *Pitx3* gene.**

A) The mouse *Pitx3* locus is depicted graphically with boxes showing the relative position of exons. Exon 2, 3, and 4 are common to mRNAs found in different tissues. Exon 1l,b is used in eye and brain whereas exon 1m is active in muscle. The diagram also shows the position of the two genomic deletions present in the *ak* natural mutant mice. The position of the rat EST that served to locate exon 1m is also shown. B) Comparison of the mouse and human *Pitx3* sequences showing percentage homology relative to the position of the

various exons. The top of the diagram shows different fragment end points (in bp) used in the present work relative to muscle transcription start site (TSS) set at +1. VISTA analysis was used to generate genomic analyses. Scale: 1 kb.

**Figure 4.3. The *Pitx3* muscle-specific promoter.**

A) Mouse, rat and human sequences in the vicinity of the putative muscle-specific transcription initiation site are compared. A predicted initiation site is shown as +1m. The position of PCR primers used to validate the 5' end of the muscle mRNA is also indicated. B) RT-PCR analysis of *Pitx3* mRNA using RNA from e15 embryos. The same reverse primer (located in exon 2 as depicted in A) was used for all PCR reactions. Lanes 1-8 used the corresponding forward primers depicted in A and lane 11,b used a forward primer in exon 11,b. Similar results were obtained for primers 1-8 using wild-type (WT) and aphakia (ak) samples while the exon 11,b product was only detected in WT RNA. C) Validation of primers 4-8 using genomic DNA template. D) Quantitation by RT-Q-PCR of the two *Pitx3* mRNA isoforms utilizing either exon 11,b or exon 1m in e14.5 limb buds. n.d. not detectable.

**Figure 4.4. *In vivo* activity of the *Pitx3* muscle-specific promoter.**

Various transgenes were constructed using putative promoter sequences for eye/brain or muscle expression of *Pitx3* as shown in the diagrams, and fused with the  $\beta$ Gal (LacZ) reporter gene. For each transgene, e12.5 transgenic

embryos were stained for  $\beta$ Gal activity. A representative embryo for each transgene is shown on the right of the table giving the number of embryos showing expression in each of muscle, lens, midbrain (mb), or ectopic sites. In each case, the total number of embryos examined is indicated.

**Figure 4.5. Muscle specificity of transgenic *Pitx3* promoter activity.**

A transgene A e12.5 transgenic embryo is shown after wholemount *in situ* hybridization (A, B) for comparison with wholemount *in situ* hybridization for endogenous *Pitx3* (Fig. 4.1). Expression is observed in elongating myotomes (B) as well as in developing limb bud muscle masses. The embryo was sectioned for co-staining as indicated. C) A section through a developing forelimb bud muscle shows the distribution of LacZ positive cells enlarged in D. A nearby section (E, F) was used for staining by immunohistochemistry of MyoD-positive cells. A subset of cells is positive for both LacZ and MyoD. Other sections (G, H) at hindlimb level revealed coexpression of LacZ with MyoD in a subset of myotome cells. Similarly, sections through a less developed myotome at the tail level (I, J) revealed a few LacZ-positive cells that are also positive for *Pitx3*.

**Figure 4.6. Activation of the *Pitx3* muscle promoter by MyoD.**

A) The -1597 bp *Pitx3* promoter-LacZ reporter (Transgene A) was assessed for activity by transfection in C2C12 cells maintained in exponential growth (proliferation, P) and in similar cells placed in differentiation medium for 24 h

(D). Significant  $\beta$ Gal activity was observed in differentiating cells whereas the level of  $\beta$ Gal activity in proliferating cells was very low. Data are shown in Relative Light Units (RLU) for the  $\beta$ Gal assay. B) *Pitx3* mRNA levels were measured by RT-Q-PCR in cultures of similarly (P, D) treated C2C12 cells. C) The activity of deletion mutants of the  $-1597$  bp *Pitx3* muscle promoter reporter was assessed upon transfection into L6 cells in the presence or absence of expression vectors for MyoD and E47 (0.25 or 1  $\mu$ g each). D) Activity of 5' deletion mutants of the *Pitx3* promoter in proliferating (P) or differentiating (D) C2C12 cells. Data represent the means  $\pm$  s.e.m. of 3-5 experiments, each performed in duplicates.

**Figure 4.7. Analysis of *Pitx3* gene locus by ChIP in e13 limb buds.**

A) Position of Q-PCR primers used for ChIP analyses. B) ChIP analysis of myogenin and MyoD in *Pitx3* regulatory sequences of wild-type limbs. C) ChIP analyses of the promoter marker tri-methyl-lysine4 histone H3 (H3K4me3) at the *Pitx3* locus of wild-type and *ak* mice. D) ChIP analyses of RNA polymerase II recruitment at the *Pitx3* locus of wild-type and *ak* mice. Dashed lines indicate background ChIP signals assessed using non-immune IgG control. Data represent the means  $\pm$  s.e.m. of four samples.

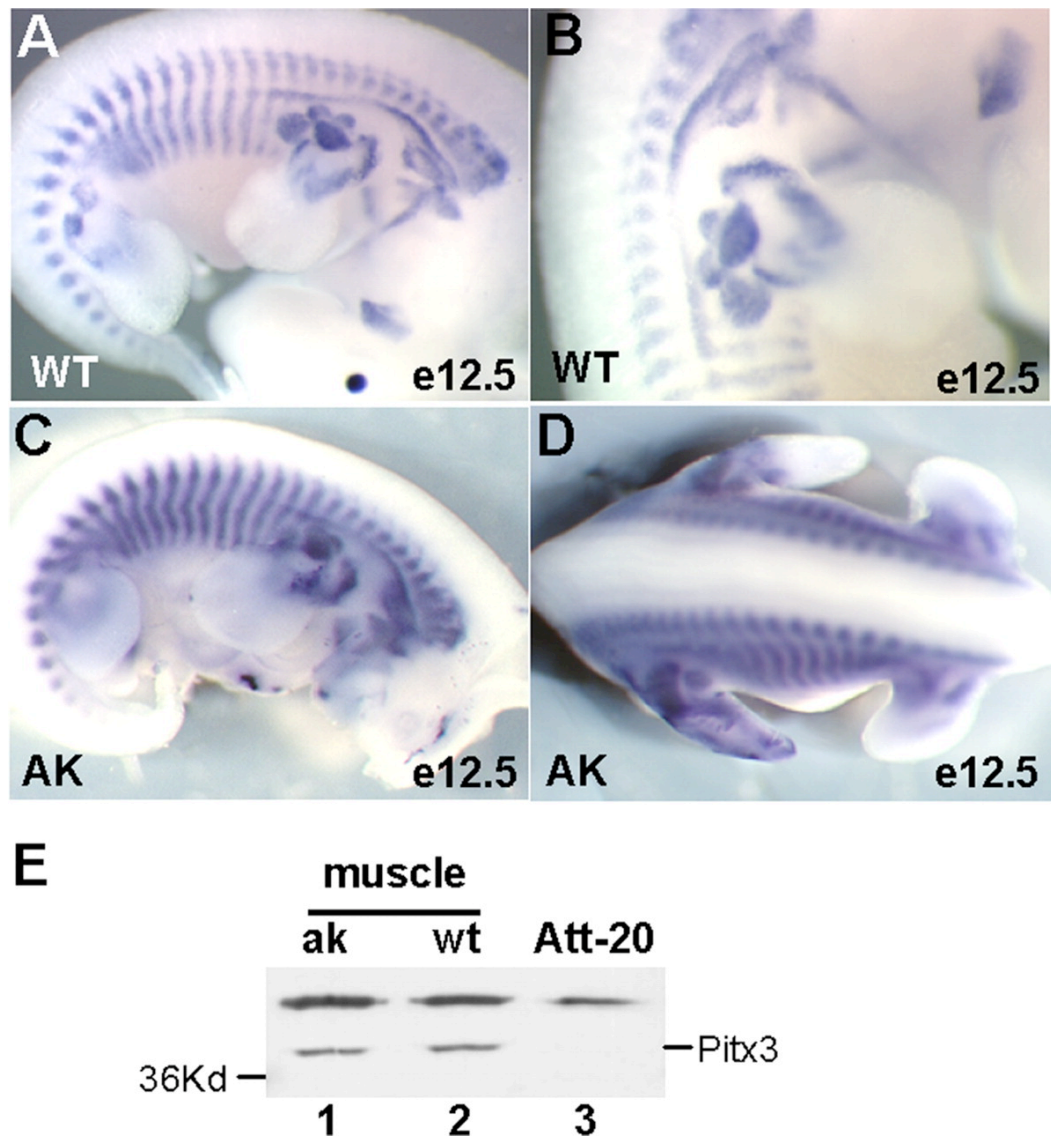
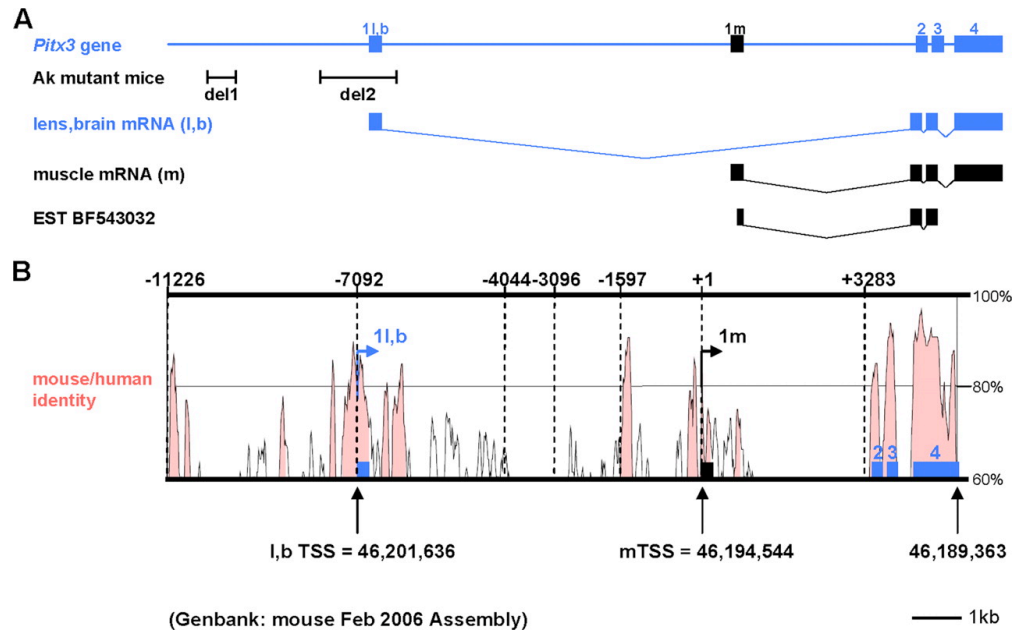


Figure 4.1 *Pitx3* is expressed in myotome and developing skeletal muscles of *ak* mutant mice that carry deletions in the *Pitx3* locus.



**Figure 4.2 Structure of the *Pitx3* gene.**



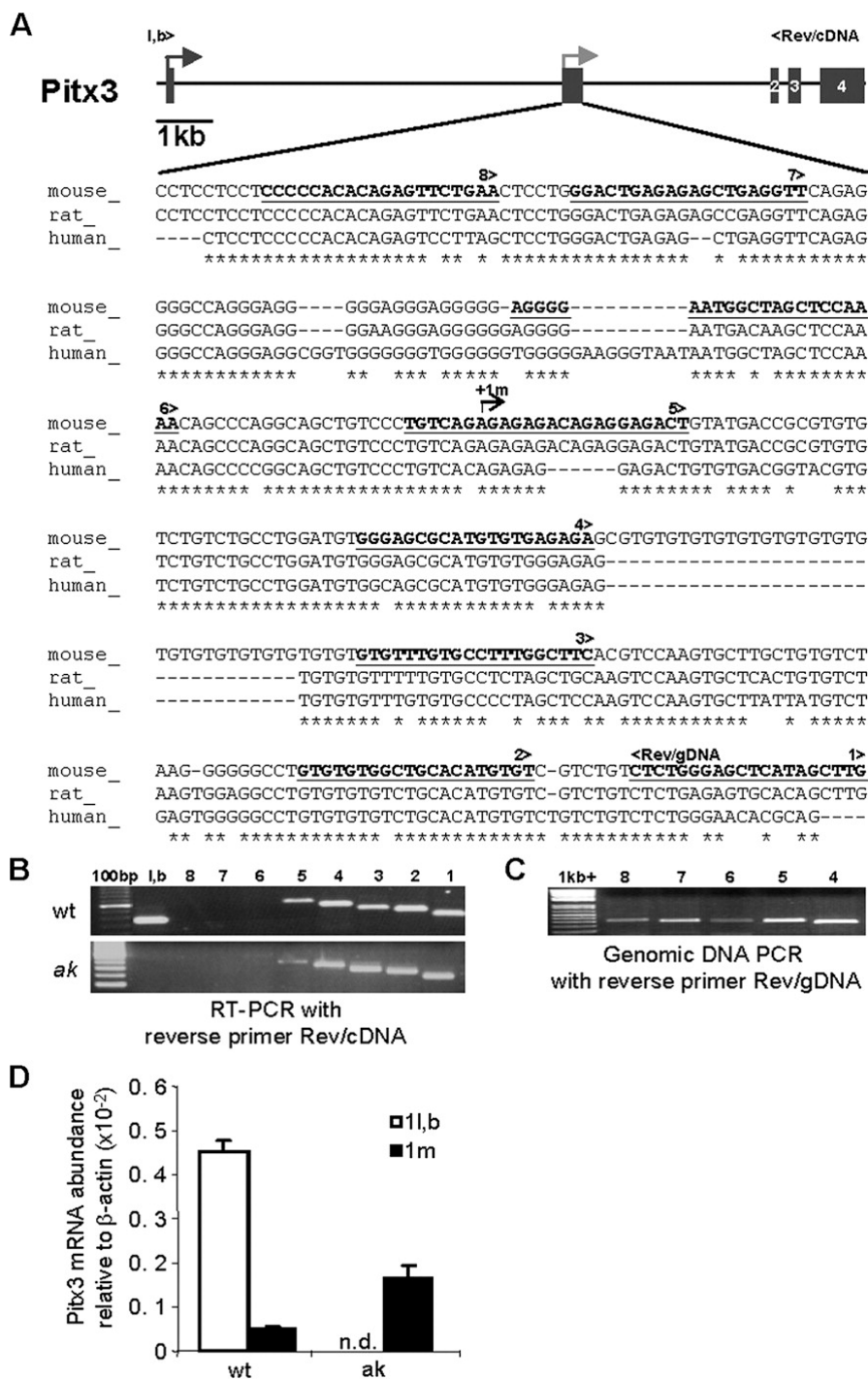
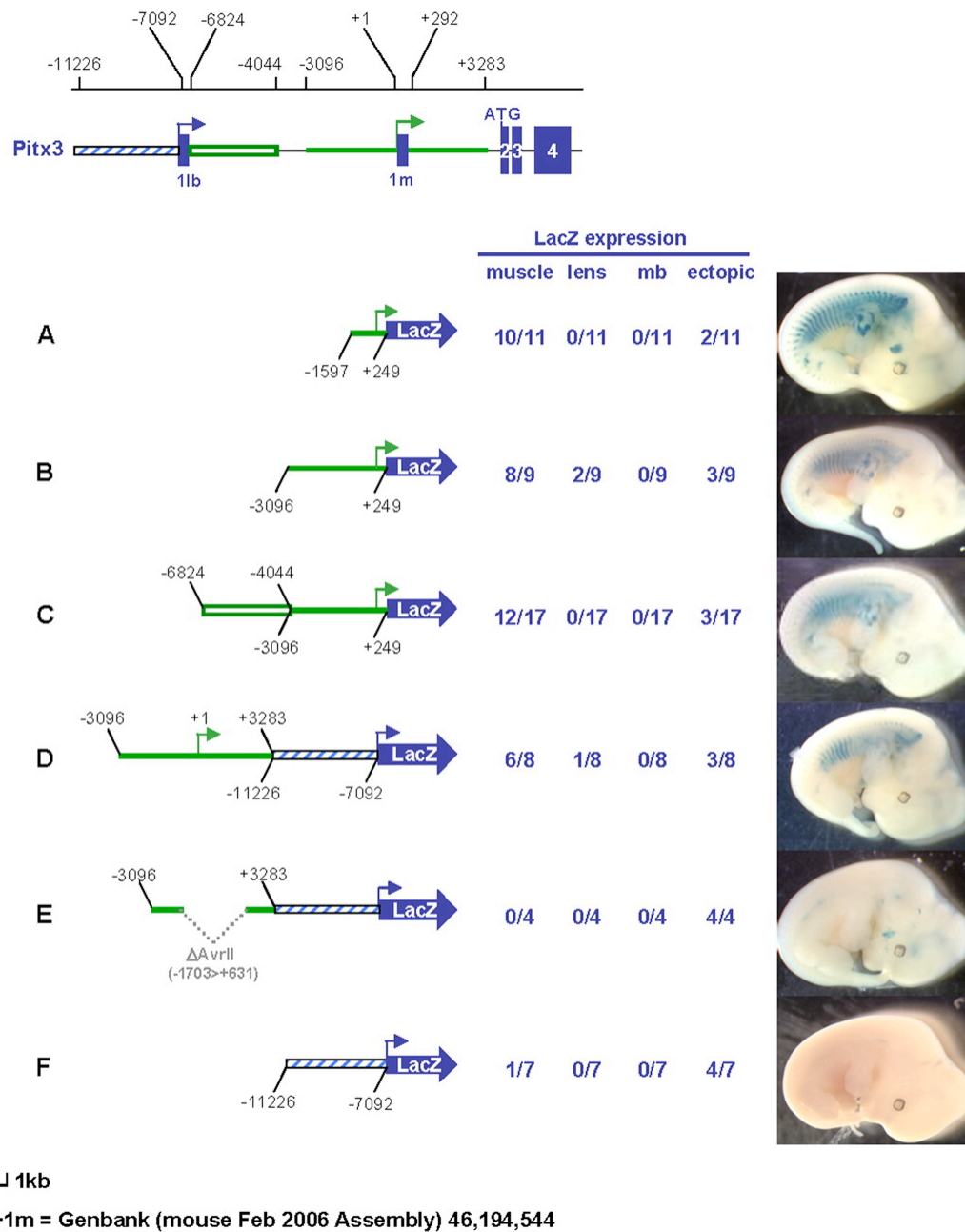


Figure 4.3 The *Pitx3* muscle-specific promoter.



**Figure 4.4** *In vivo* activity of the *Pitx3* muscle-specific promoter.

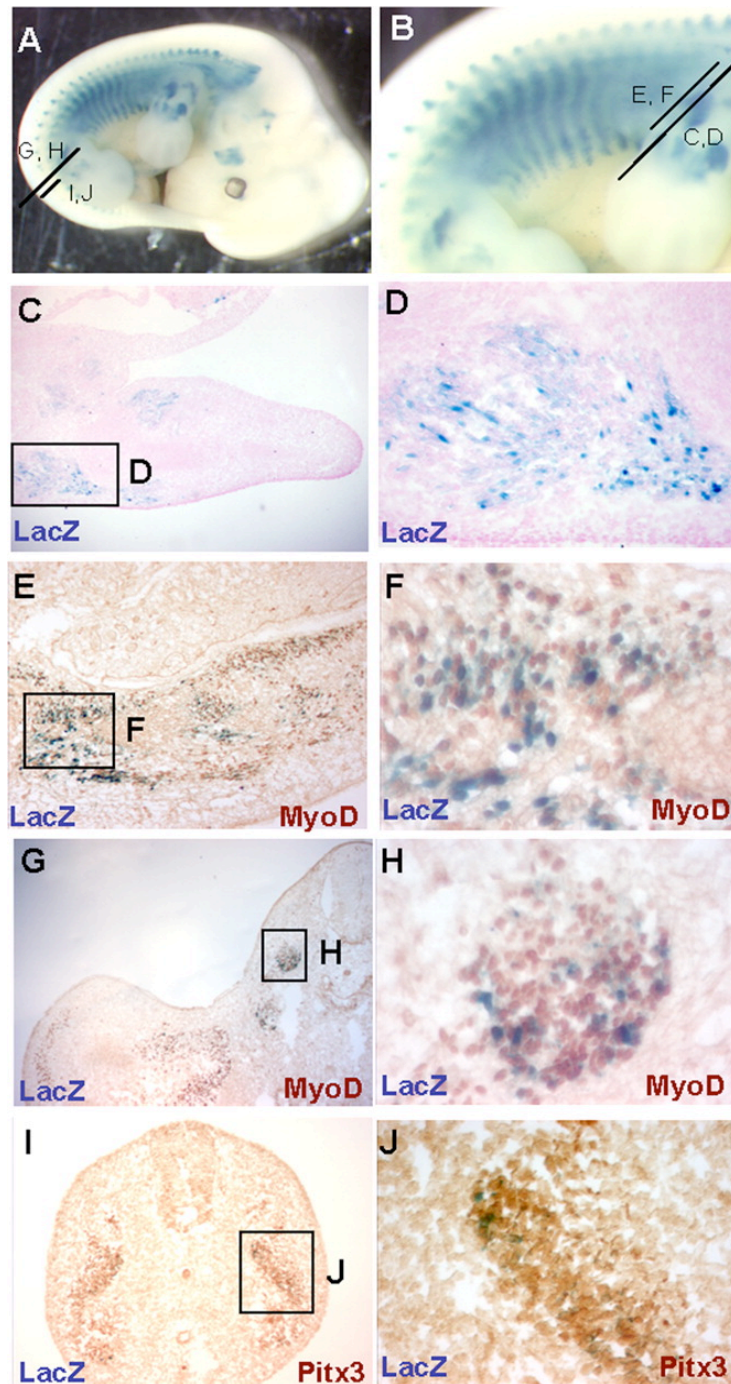


Figure 4.5 Muscle specificity of transgenic *Pitx3* promoter activity.

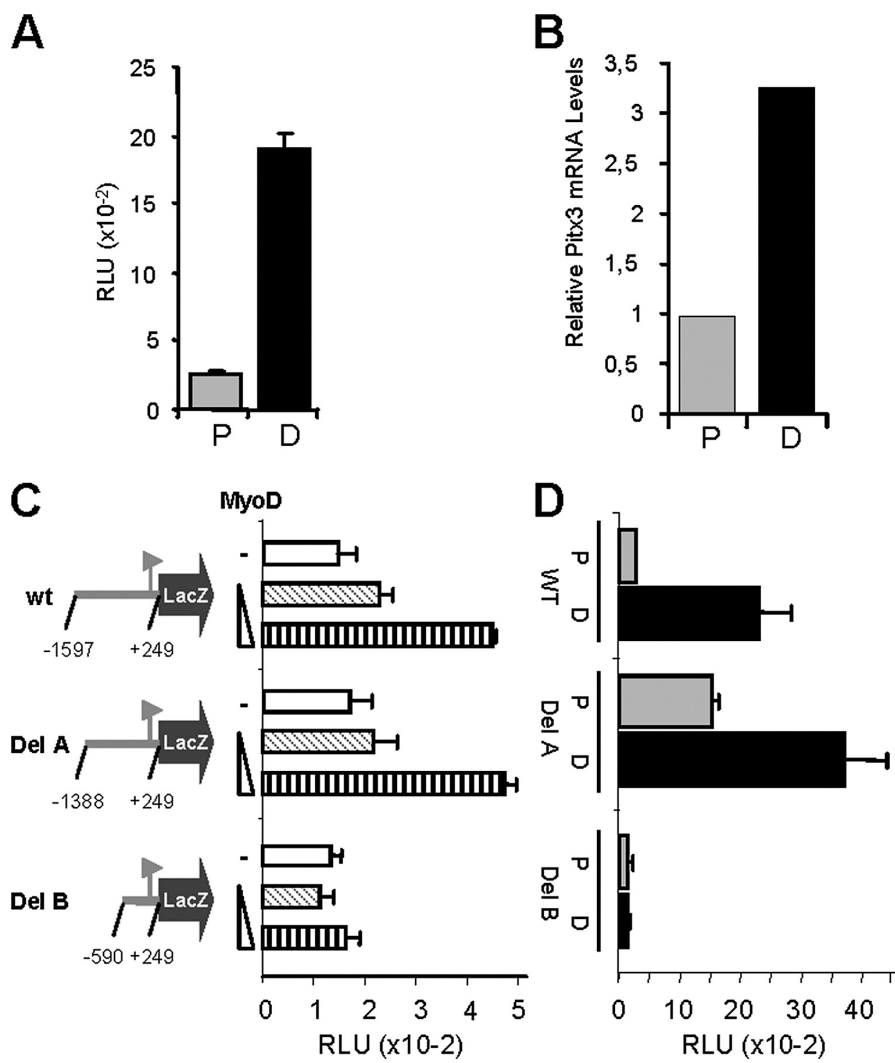


Figure 4.6 Activation of the *Pitx3* muscle promoter by MyoD.

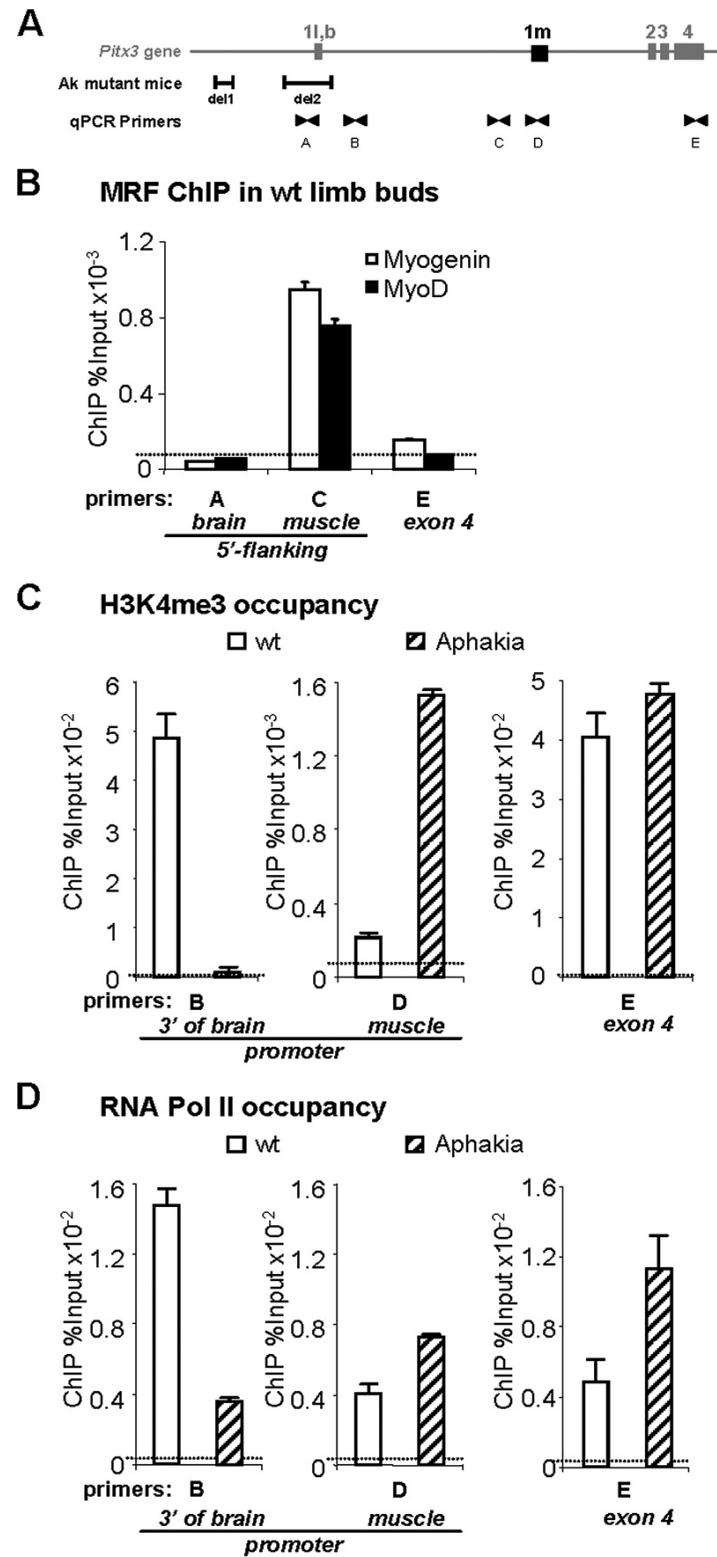


Figure 4.7 Analysis of *Pitx3* gene locus by ChIP in e13 limb buds.

## **CHAPITRE 5**

## Chapitre 5 : Résultats supplémentaires

Afin de mieux comprendre les programmes génétiques en aval des facteurs Pitx1, Tbx4 et Tbx5, nous avons entrepris de déterminer les sites de fixation de ces facteurs dans le génome.

### 5.1 Régulation transcriptionnelle de *Tbx4* par Pitx1.

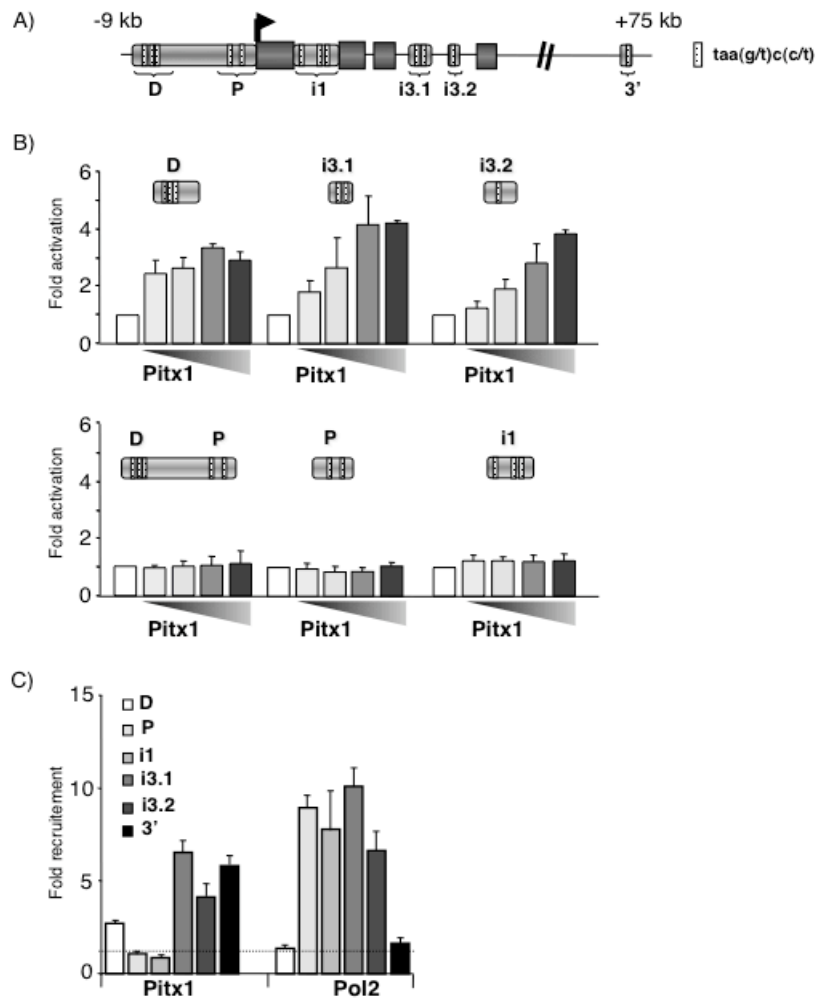
Des expériences entreprises dans le laboratoire ont initié l'exploration de la relation épistatique entre Pitx1 et Tbx4. En effet, les travaux antérieurs ont montré la diminution d'expression de Tbx4 dans les membres postérieurs des mutants *Pitx1* (Lanctôt et al. 1999; Marcil et al. 2003). Cette diminution d'expression, nous avons pu l'évaluer plus précisément, pour constater une quantité résiduelle de 45% de l'ARN messager de *Tbx4* dans les membres postérieurs déficients en *Pitx1*, alors que le taux résiduel de protéines est d'environ de 23% (Fig. 5.1).

Pour commencer à explorer la relation entre *Pitx1* et *Tbx4*, nous avons cherché les éléments du locus de *Tbx4* par lesquels une telle régulation pouvait intervenir. Différents sites candidats ont été identifiés et nous avons pu mettre en évidence une activation des deux éléments introniques (du troisième intron; i3.1 et i3.2) et d'un élément situé à 9 kilobases en amont du site d'initiation prédit de la transcription (Dumontier E, Coulon V, Drouin J; données non publiées). En parallèle et grâce aux expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que nous avons réalisée sur des

bourgeons de membres postérieurs de souris du jour embryonnaire 12, nous avons pu montrer une fixation spécifique de Pitx1 sur ces différents éléments. Nous avons donc produit des constructions pour l'injection de transgènes rapporteurs chez la souris afin de déterminer l'activité de ces séquences chez la souris (Jean-François Ouimette, Marisol Lavertu Jolin, Jacques Drouin, données non publiées).

Une étude publiée pendant ce travail a fait état de travaux sur la régulation de *Tbx4*, où ils ont identifié deux éléments cruciaux pour l'expression de ce gène dans les membres durant le développement (Menke et al. 2008). Un de ces éléments correspond à l'élément distal identifié en amont (-9 kb; HLEA) du site d'initiation de la transcription de *Tbx4*; cet élément récapitule une partie de l'expression de *Tbx4* dans les membres de souris, tel que mis en évidence par des expériences de transgénèse. L'autre élément se situe en aval de *Tbx4* (+75 kb chez la souris; HLEB) et dirige aussi l'expression d'un gène rapporteur dans les membres. Les auteurs rapportent par ailleurs que l'introduction de mutations des sites Pitx1 dans la région en amont (HLEA) perturbe l'activité de la région dans les membres en développement (Menke et al. 2008). Les auteurs ont aussi pu déterminer que les régions introniques ciblent l'expression de *Tbx4* de façon prédominante dans les poumons, un site d'expression normal de *Tbx4* chez la souris (Cebra-Thomas et al. 2003).





**Figure 5.1 Régulation de l'expression de *Tbx4* par Pitx1.**

**A)** Schéma du locus de *Tbx4* avec la position des éléments isolés et des sites putatifs de liaison de Pitx1. **B)** Essai rapporteur transcriptionnel des éléments indiqués en réponse à des doses croissantes de Pitx1. (En collaboration avec Emilie Dumontier et Marisol Lavertu Jolin) **C)** Fixations *in vivo* dans les bourgeons postérieurs e12 de Pitx1 et de l'ARN polymérase II (Pol2).

Suite à la parution de cet article, nous n'avons pas poursuivi l'investigation de la régulation de *Tbx4*. Nous avons tout de même déterminé la présence de Pitx1 sur l'élément distant en aval (HLEB; Fig. 5.1). Par ailleurs, l'identification de la fixation de Pitx1 à des séquences régulatrices de *Tbx4* dans les membres confirme l'applicabilité de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine dans ce tissu. Sur ces bases, nous avons donc poursuivi nos tentatives d'identification à large échelle des cibles de Pitx1, *Tbx4* et *Tbx5*.

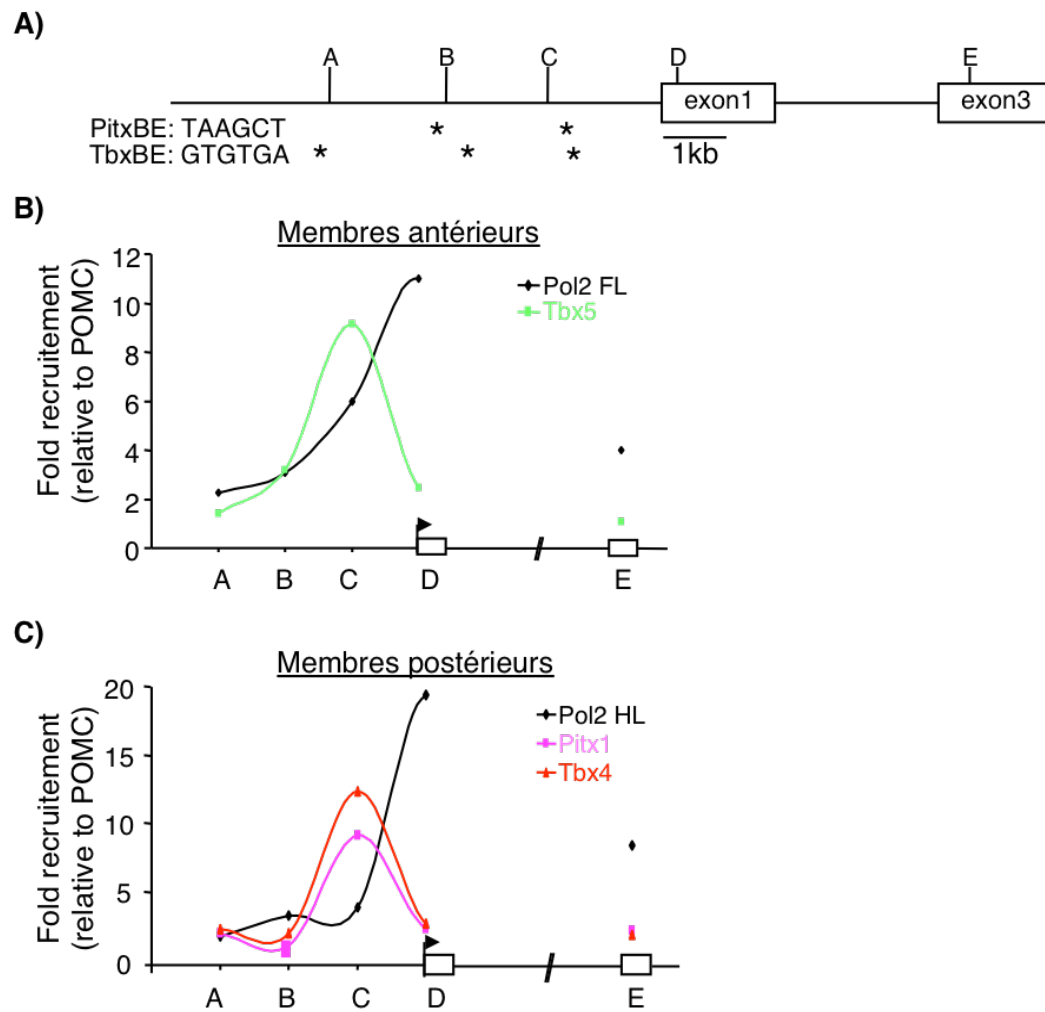
## **5.2 Sites de fixation de Pitx1, *Tbx4* et *Tbx5* dans le promoteur de *Fgf10* et *Tbx2*.**

Afin d'évaluer la validité d'un recoupement significatif des programmes en aval de *Tbx4* et *Tbx5*, nous nous sommes appuyés sur la technique d'immunoprécipitation de la chromatine pour élucider les cibles de ces facteurs de transcription, à défaut de pouvoir établir le transcriptome des membres des mutants murins. Comme pour Pitx1, nous avons cherché à découvrir des cibles de ces facteurs, afin de valider la faisabilité de cette expérience dans nos conditions expérimentales. Nous avons été orientés sur un gène, *Fgf10*, dont l'expression est capitale pour l'initiation et la maintenance de la croissance des membres chez la souris (Min et al. 1998). En effet, aussi bien le mutant *Tbx5* que le mutant *Tbx4* ont des défauts d'expression dans ce gène et des sites potentiels de la liaison à la boîte T ont

été identifiés précédemment (Agarwal et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2003; Rallis et al. 2003). De plus, un de ces sites (C) semble conférer la réponse à Tbx5 en transfection transitoire (Agarwal et al. 2003).

Nous avons donc évalué la présence de Tbx4 et Tbx5 sur le promoteur de *Fgf10* dans les bourgeons, postérieurs et antérieurs respectivement, de membres de souris au jour embryonnaire 12. Parmi la région promotrice en amont, on retrouve 3 sites putatifs pour les boîtes T, mais nous avons pu détecter spécifiquement la présence de Tbx4, dans les membres postérieurs, et de Tbx5, dans les antérieurs, seulement sur le site C (Fig. 5.2). Quoique pas surprenant en soit, ce résultat apporte la preuve que la régulation de *Fgf10* par Tbx4 et Tbx5 est directe et suggère que ces deux facteurs se lient sur des sites communs pour réguler des cibles communes.

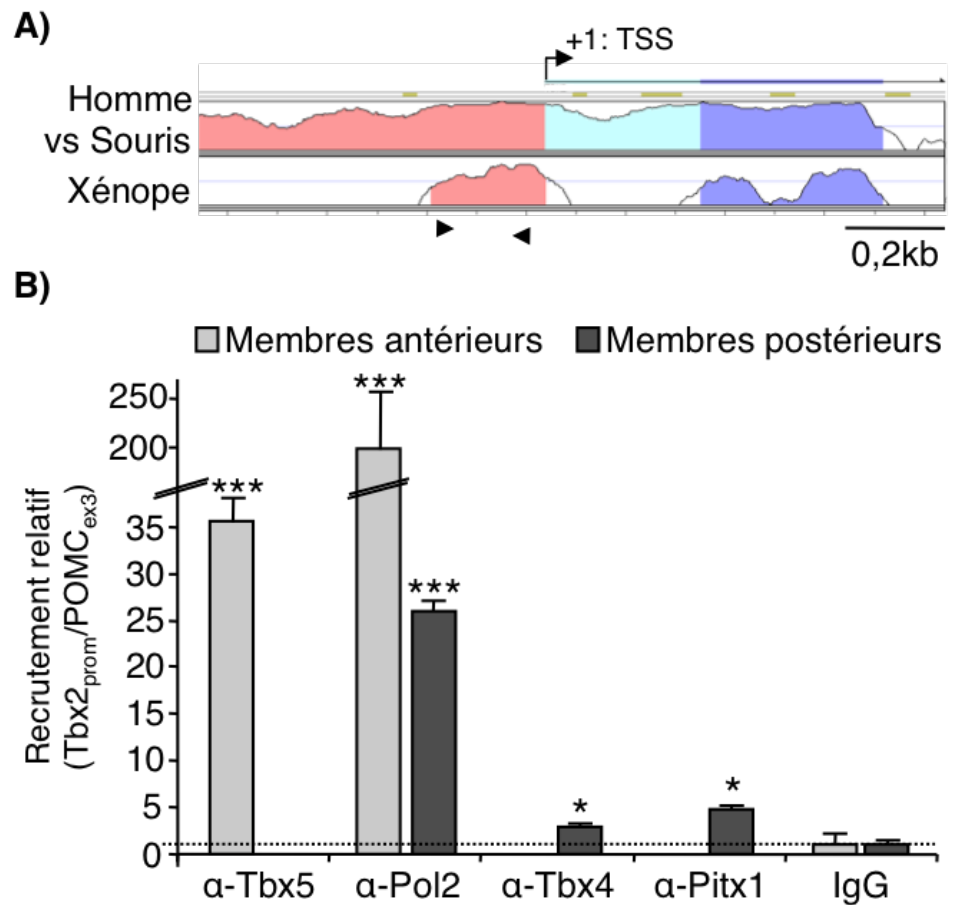
De façon intéressante, des sites putatifs pour la liaison des homéodomaines de la sous-famille Pitx sont aussi présents dans le promoteur, dont un à proximité du site C qui recrute Tbx4. La liaison de Pitx1 est aussi détectée sur cet élément, apportant du support à l'hypothèse que Tbx4 et Pitx1 régulent directement et ensemble des gènes essentiels à la croissance du membre, comme prédit par l'analyse de leurs mutants murins respectifs. Il est intéressant de noter que des résultats comparables ont été obtenus avec un autre anticorps Tbx5, dans le laboratoire Susan Mackem (Susan Mackem, *11th International Conference on Limb Development and Regeneration*, Williamsburg).



**Figure 5.2 Liaison au promoteur de Fgf10**

**A)** Représentation graphique du locus de Fgf10 avec la position des sites de liaison (\*) pour les Pitx (PitxBE) et pour les Tbx (TbxBE). Les lettres indiquées au-dessus représentent la position des amplicons de qPCR. **B)** Recrutement de Tbx5 et de l'ARN polymérase II (Pol2) dans les membres antérieurs à e11.5. **C)** Recrutement de Pitx1, Tbx4 et Pol2 dans les membres postérieurs à e 11.5.

Un autre gène dont l'expression est affectée en absence de *Tbx4* et *Tbx5* est un autre membre de la famille des boîtes T à être exprimé dans le bourgeon de membre en développement, *Tbx2*. La régulation de *Tbx2* n'a pas été décrite, mais l'alignement de séquence, grâce au logiciel Multi-LAGAN et analysé avec VISTA (Brudno et al., 2003; Frazer et al., 2004), nous a permis d'identifier une région très conservée, d'environ 200 paires de bases, entre l'humain, la souris et le xénope, et qui est située juste en amont du site d'initiation de la transcription (Fig. 5.3). Comme pour l'élément proximal de *Fgf10*, nous avons pu mettre en évidence une liaison de *Tbx4*, *Tbx5*, mais aussi *Pitx1* sur le promoteur proximal de *Tbx2* dans les bourgeons de membres en développement. Contrairement à ce que nous avons pu détecter sur l'élément C de *Fgf10*, *Tbx5* semble être recruté très fortement au promoteur de *Tbx2* alors que le recrutement pour *Tbx4* et *Pitx1* est plus modeste. Indépendamment de cette différence, nous avons montré que le promoteur de *Tbx2* est occupé autant par *Pitx1* et *Tbx4* dans les membres postérieurs que par *Tbx5* dans les antérieurs.



**Figure 5.3 Liaison au promoteur proximal de Tbx2.**

A) Alignement du génome de l'homme, de la souris et du xénope; les pics représentent un degré de conservation supérieur à 50% ([http://lagan.stanford.edu/lagan\\_web/index.shtml](http://lagan.stanford.edu/lagan_web/index.shtml)). Les têtes de flèches indiquent la position des amorces utilisées en qPCR. B) Recrutement au promoteur proximal de Tbx2 relatif à celui dans l'exon 3 de POMC avec les anticorps indiqués. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,01$ .

## **CHAPITRE 6**

## Chapitre 6 : Discussion

Les études présentées dans le présent travail ont permis d'identifier le mécanisme de détermination de l'identité postérieure. D'une part, nous avons démontré l'importance de *Tbx4* dans la mise en place de l'identité postérieure. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence l'importance d'une fonction répressive, unique à *Tbx4*, essentielle pour ce processus. Enfin, nous avons obtenu des données sur les tenants moléculaires et mécanistiques de cette répression. Suite à ces travaux, il est intéressant d'intégrer les nouvelles données présentées avec la littérature existante et de discuter des pistes qui ont été soulevées par ces découvertes; d'abord sur la mise en place de l'identité, sur les rôles respectifs de *Pitx1*, *Tbx4* et *Tbx5* dans la régulation d'un programme de formation des membres.

### 6.1 Établissement de l'identité des membres.

Si les processus morphogénétiques déployés pour l'élaboration des membres ont été et sont toujours l'objet de plusieurs études, les mécanismes déployés pour l'acquisition de la spécificité des membres, soit la différenciation des membres antérieurs et postérieurs, demeurent toujours inconnus en grande partie. On commence toutefois à comprendre les facteurs qui en contrôlent les étapes fondamentales. Une façon classique en biologie du développement d'aborder le sujet est d'établir une distinction entre la

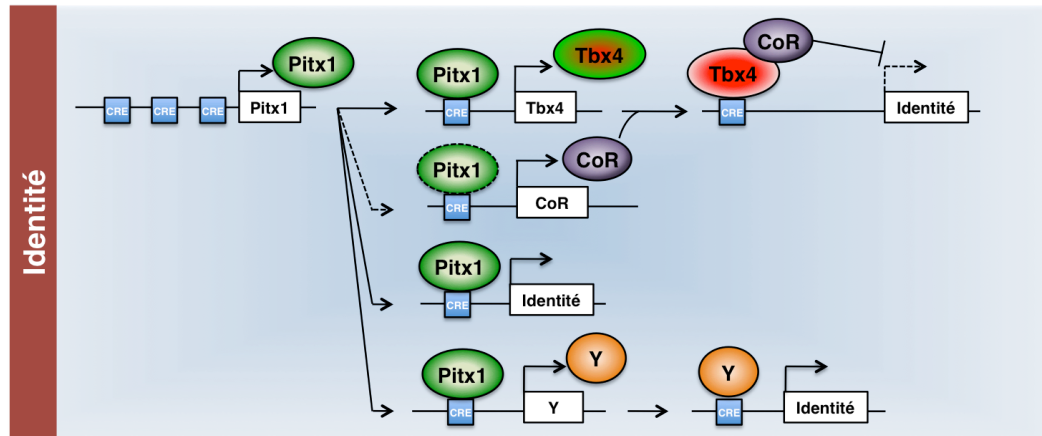


spécification d'un sort et la détermination de celui-ci. Les travaux initiaux réalisés chez le poulet ont permis de mettre en évidence que l'identité des membres est fixée (déterminée) avant l'émergence des bourgeons. En effet, la transplantation du territoire présomptif de membre entraîne la formation d'un membre dont l'identité est toujours celle d'origine. D'un point de vue moléculaire, on dispose de certains marqueurs, *Pitx1*, *Tbx4* et *Tbx5*, dont l'expression est suggestive de leurs rôles respectifs dans ces deux étapes. L'expression de *Tbx4* et de *Tbx5* s'amorce tout juste avant l'apparition du bourgeon de membre, à un moment qui correspond à la détermination de l'identité (Saito et al. 2006). D'autre part, il semble que *Pitx1*, exprimé beaucoup plus tôt, lors de la formation du compartiment postérieur de la lame latérale (Lanctôt et al. 1997), et de façon moins restreinte que *Tbx4*, soit le gène permettant la spécification de l'identité postérieure. Dans cette optique, l'identité antérieure serait spécifiée par défaut et dans ce contexte, *Tbx5*, comme *Tbx4*, serait plutôt un candidat pour contrôler la détermination. Ceci étant, il apparaît que *Tbx4* et *Tbx5* ne possèdent pas une activité équivalente et par extension, qu'ils n'ont probablement pas un rôle équivalent lors du développement du membre et plus spécifiquement dans l'acquisition de l'identité.

D'une part, le rôle de *Tbx5* semble être confiné, pour la majeure partie, à l'initiation de la croissance du membre antérieur, tel que suggéré par son inactivation conditionnelle suivant l'initiation de la croissance du bourgeon qui ne cause pas un phénotype marqué (Hasson et al. 2007). De plus,

l'expression de *Tbx5* dans un bourgeon déficient en *Pitx1* et partiellement déficient en *Tbx4* ne permet pas d'implémenter de nouvelles caractéristiques au membre, si ce n'est un déplacement de la hanche. Le contexte étant possiblement important pour l'action de *Tbx5*, on ne peut exclure que les conditions ectopiques du territoire postérieur soient inadéquates pour révéler une telle activité. Pour supporter une telle hypothèse, il faut se rappeler que la surexpression chez le poulet de *Tbx5* dans les membres postérieurs suffit à convertir l'identité des pattes (Takeuchi et al. 1999). Cependant, l'expression de *Tbx5* dans les pattes entraîne la forte diminution d'expression de *Tbx4*; une évidence indirecte de l'apport crucial de *Tbx4* en aval de *Pitx1* dans l'identité postérieure qui fournit un indice supplémentaire indiquant que *Tbx4* et *Tbx5* n'ont pas la même activité lors du développement du membre. Ainsi, il semble vraisemblable que *Tbx5* ne soit impliqué ni dans la spécification, ni dans la détermination de l'identité. De fait, *Tbx5* semble plutôt être un joueur essentiel dans l'initiation de la croissance, renforçant l'interprétation de l'existence d'un programme par défaut qui contrôle la formation du membre antérieur et par le fait même, l'identité antérieure.

Dans les membres postérieurs, ce programme serait contrôlé différemment par *Pitx1* et par *Tbx4* (Fig. 6.1). Le rôle de *Pitx1* semble largement dépendre de son contrôle de l'expression de *Tbx4* et les résultats présentés dans cette thèse montrent en effet que la restauration de l'expression de *Tbx4* permet de compenser une majorité des défauts associés à la perte de *Pitx1*. Si à l'instar de *Tbx5*, *Tbx4* est manifestement



**Figure 6.1 Rôles proposés de Pitx1 dans le contrôle de l'identité postérieure**

Le contrôle de l'identité des membres dépend de l'apport en amont de Pitx1. Son expression dans le mésoderme de la lame latérale postérieure est sous le contrôle d'un « code postérieur » qui agit via des CRE (Chan et al. 2010). En aval de Pitx1, Tbx4 fonctionne avec son co-répresseur, dont l'expression pourrait être sous le contrôle de Pitx1, pour réprimer un programme d'identité par défaut. Alternativement, Pitx1 pourrait contrôler directement, ou via un autre facteur inconnu (Y), ce programme. CRE; éléments de régulations en *cis*, CoR; co-répresseur, Y : facteur inconnu. Le pointillé représente un rôle hypothétique (voir discussion).

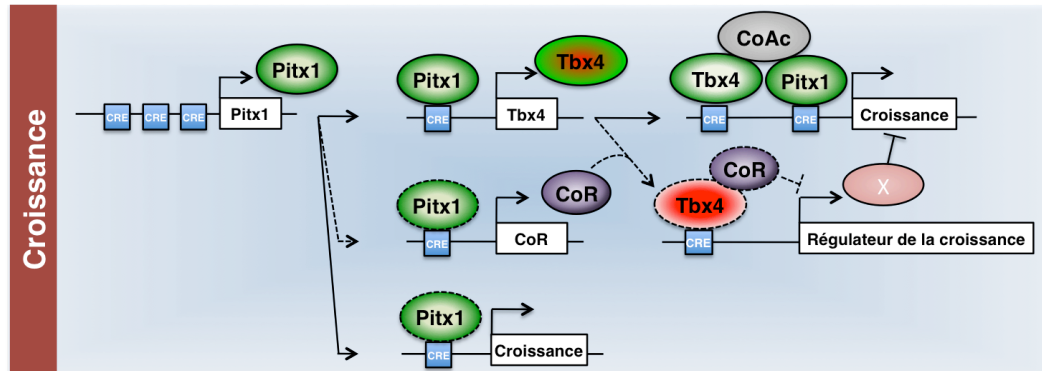
impliqué dans la régulation de la croissance du membre (même si les manifestations de cette régulation ne sont pas équivalentes; Hasson et al. 2007; Naiche et Papaioannou 2007), il apparaît que seul *Tbx4* est impliqué dans le processus de mise en place de l'identité, via un domaine régulateur spécifique. Nous avons aussi révélé que ce contrôle peut s'exercer indépendamment de *Pitx1* (Ouimette et al. 2010). Cette découverte permet de centrer les recherches sur le programme générique qui serait en aval des *Tbx* afin d'identifier le sous-ensemble des cibles qui, selon le modèle proposé, seraient régulées différemment pour générer l'identité des membres.

## **6.2 Le programme générique de développement des membres et sa régulation par *Pitx1*, *Tbx4* et *Tbx5*.**

Il a été montré par de nombreuses et élégantes études génétiques que le développement des membres était régulé par des relations complexes entre les voies de signalisations et les cascades transcriptionnelles afin de former un réseau essentiel pour la formation de cet organe (chapitre 1.2). Ce réseau semble effectivement à la base de la formation d'un membre, qu'il soit d'identité antérieure ou postérieure. Ensemble, ces observations viennent conforter l'hypothèse d'un programme générique de formation des membres.

À la lumière des résultats présentés dans cette thèse et des travaux ultérieurs, il apparaît que ce programme est sous le contrôle des facteurs de transcription *Pitx1* et *Tbx4* dans le territoire postérieur et *Tbx5*, dans

l'antérieur. Alors que *Tbx5* semble contrôler seul ce programme pour le développement des membres antérieurs, *Pitx1* et *Tbx4* sont requis pour celui des postérieurs. D'ailleurs, le mutant *Tbx5* montre un phénotype des membres antérieurs beaucoup plus prononcé que celui des mutants simples de *Tbx4* ou *Pitx1*. Il semble donc y avoir une certaine redondance dans la régulation des gènes de la croissance par *Pitx1* et *Tbx4* (Fig 6.2). Les résultats présentés à la figure 5.2 supportent cette conclusion, du moins pour la régulation de *Fgf10*; on sait d'ailleurs que l'expression de *Fgf10*, essentielle pour la croissance des membres (Min et al. 1998), est complètement déficiente dans le territoire présomptif du membre antérieur dépourvu de *Tbx5* (Agarwal et al. 2003; Rallis et al. 2003), alors que son expression semble initiée correctement en l'absence de *Tbx4* ou de *Pitx1* au niveau postérieur (Marcil et al. 2003; Naiche et Papaioannou 2003). L'expression de *Fgf10* est vraisemblablement plus affectée dans les mutants composites *Pitx1* et *Pitx2*, où l'on constate l'absence quasi complète de membres postérieurs et une expression grandement déficiente du *Fgf8* de la crête apicale (Marcil et al. 2003). On sait par ailleurs que l'expression de *Fgf10* ne semble pas être correctement maintenue en l'absence de *Tbx4* (Naiche et Papaioannou 2003; 2007), même si le phénotype des mutants conditionnels de *Tbx4* ne semble pas concorder avec un arrêt de croissance attendu à la suite d'une abrogation de la transcription de *Fgf10*. En effet, le phénotype des mutants

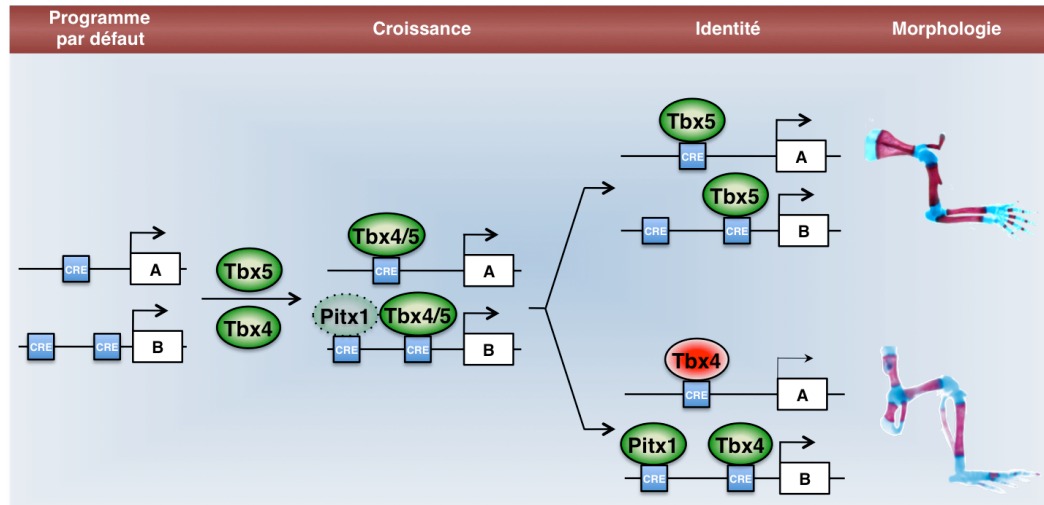


**Figure 6.2 Rôles potentiels de *Pitx1* dans le contrôle de la croissance des membres postérieurs.**

La croissance des membres postérieurs est contrôlée par *Pitx1*, vraisemblablement via son contrôle de l'expression de *Tbx4*. Cette régulation par *Tbx4* est vraisemblablement directe, comme observée sur le promoteur de *Fgf10*, mais aussi possiblement indirecte (voir texte pour précision). Enfin, il n'est pas exclu que *Pitx1*, en association avec *Tbx4* ou seul, exerce un contrôle direct sur des gènes de croissance. CRE; élément de régulation en cis. Les pointillés représentent des rôles hypothétiques (voir discussion).

*Prx1-Cre; Tbx4<sup>fllox/flox</sup>*, où l'inactivation est spécifique au membre, est restreint aux segments proximaux. Notamment, les mutants présentent un autopode relativement normal. Il semble donc y avoir un délai précoce de la croissance, qui est compensé par la suite. Dans ce contexte, l'interprétation des auteurs repose sur la nécessité, post-initiation et transitoire, de *Tbx4* dans l'expression de *Fgf10*. Un facteur candidat dans la régulation de *Fgf10* est évidemment *Pitx1* (Fig. 6.2 et 6.3). Son expression est aussi présente dans tout le bourgeon et des défauts de croissance sont observés en absence de *Pitx1*. Nous avons pu montrer une liaison de *Pitx1* au promoteur proximal de *Fgf10*, au cours du développement des membres, sur des sites potentiels près de celui de *Tbx4*. Enfin, si l'on observe bien une compensation de la perte de croissance des membres postérieurs des mutants *Pitx1*<sup>-/-</sup> en réexprimant *Tbx4*, cette compensation n'est pas parfaite. L'hypothèse du biais expérimental étant toujours possible, il est aussi probable que les facteurs *Pitx*, et plus particulièrement *Pitx1*, contrôlent directement la croissance (Fig. 6.2).

En plus de *Fgf10*, il apparaît que *Pitx1* et *Tbx4* partagent d'autres cibles, notamment sur les loci de *Tbx2* et *Alx4* (Naiche et Papaioannou 2003; Naiche et Papaioannou 2007; chapitre 5 et données non montrées). Ceci étant, les données disponibles pour vraiment justifier une collaboration transcriptionnelle sur des cibles communes sont déficientes. Il apparaît essentiel en effet d'établir à la fois un transcriptome des mutants *Pitx1* et *Tbx4* afin d'avoir une idée réaliste d'une éventuelle redondance ou



**Figure 6.3 Contrôle d'un programme générique de formation des membres par Tbx4 et Tbx5**

Le développement d'un membre est soumis à une régulation par les facteurs Tbx4 et Tbx5. Selon le modèle proposé, la régulation transcriptionnelle serait essentielle pour assurer la croissance du membre. Les membres antérieurs seraient représentatifs de l'identité par défaut, permise par l'activité positive de Tbx5. Les membres postérieurs seraient une condition dérivée, dépendante de l'activité transcriptionnelle répressive de Tbx4. La modulation de l'activité transcriptionnelle serait dépendante du contexte, via l'influence directe ou indirecte de Pitx1. Selon ce modèle, cette divergence d'activité de Tbx5 et Tbx4 est responsable des différences morphologiques des membres antérieurs et postérieurs. Le pointillé représente un rôle restreint de Pitx1 dans les membres postérieurs. CRE; élément de régulation en cis.



coopération. Il semble aussi essentiel d'établir une cartographie des sites de liaison de ces facteurs de transcription; ces données, recoupées avec les différents transcriptomes, permettraient justement d'étoffer un tel modèle. Nous avons tenté de déterminer les sites de liaison de ces facteurs, ce qui nous a permis au passage de découvrir les sites de liaison de Tbx4, Tbx5 et Pitx1 dans les promoteurs de *Fgf10* et *Tbx2*. Malheureusement, des limitations techniques nous ont empêchées d'établir ces sites *in vivo*, en raison de la sensibilité de la technique d'hybridation sur micropuces des immunoprécipitats de chromatine; cette limitation est fondamentalement attribuable à la qualité des anticorps spécifiques dirigés contre Pitx1, Tbx4 et Tbx5, qui ne permettent pas d'enrichir suffisamment les fragments d'ADN réellement liés par ces facteurs. Cette expérience, théoriquement réalisable, est maintenant encore plus envisageable depuis l'apparition de techniques de séquençage à haut débit, qui permettent de diminuer la quantité d'ADN précipité et qui semblent beaucoup plus sensibles que les technologies d'hybridations sur puces. Il est toutefois crucial de développer des stratégies d'optimisations pour chaque anticorps, conditions qui semblent varier en fonction du contexte, tout particulièrement *in vivo*, dans des bourgeons où, en dépit d'une homogénéité apparente, de nombreux événements cellulaires (différentiation en de multiples lignages, sécrétion de la matrice extracellulaire, présence de vascularisation etc.) rendent l'expérience plus difficile comparativement aux expériences sur des cellules en culture. En effet, de nombreux types cellulaires sont présents, même à un stade précoce de

développement, ce qui a pour effet de diminuer la spécificité du matériel employé pour faire les immunoprécipitations. Afin de s'affranchir de ces limitations potentielles, il semble souhaitable de recourir à une approche expérimentale alternative et possiblement complémentaire.

En dépit d'un éventuel problème de pertinence biologique, il semble raisonnable de recourir à des modèles cellulaires afin d'obtenir le type de données qu'on pourra difficilement obtenir sans les mutants murins (par exemple pour *Tbx4* et *Tbx5*, où aucune donnée n'est disponible) et sans anticorps compétents pour la technique d'immunoprécipitation de la chromatine. Parmi ces alternatives, l'approche la plus sensée semble la génération de protéines chimériques, où une protéine d'intérêt, soit *Tbx4*, *Tbx5* ou encore *Pitx1* serait fusionné soit avec le puissant domaine activateur de VP16, soit avec une étiquette (« tag »), et la surexpression de ces chimères dans un modèle cellulaire approprié. D'une part, la surexpression des formes « super-activateurs » permettrait, suite à la détermination du transcriptome, d'identifier les cibles transcriptionnelles de ces facteurs, une approche précédemment utilisée avec succès (McKinnell et al. 2008). D'autre part, l'emploi de protéines étiquetées permettrait de s'affranchir d'anticorps spécifiques à chaque protéine d'intérêt, de standardiser les conditions d'immunoprécipitation et ainsi d'obtenir une idée des sites de fixation des différents facteurs. La lignée cellulaire C3H10T1/2, considérée comme représentative d'un état de précurseur mésenchymateux, serait par ailleurs un modèle idéal pour entreprendre ces différentes expériences, de par leur

aisance de manipulation et ayant prouvé leur valeur dans ce type d'approche précédemment (McKinnell et al. 2008). Cette approche, non sans limitations, aurait le mérite de générer un ensemble de données qui pourraient par la suite être validées *in vivo* par les approches et outils traditionnels qui ne nous ont pas permis d'initier un tel projet à l'échelle du génome. En soit, ces données nous fourniraient une base pour évaluer la validité d'un programme générique où les Tbx ciblent les gènes assurant la croissance d'un membre, tel que proposé en figures 2.6 et 6.3. Mentionnons aussi que les plus courageux pourraient recourir au ciblage génique pour insérer, dans le génome de la souris, l'épitope de son choix, recours technique qui s'est avéré particulièrement puissant chez la levure (Lee et al. 2002). Cette technique a notamment permis de s'affranchir du manque d'anticorps efficaces dirigés contre Hand2 pour en déterminer les cibles (Rolf Zeller, *11th International Conference on Limb Development and Regeneration*, Williamsburg). Ces techniques ont pour but d'identifier les cibles en aval des Tbx mais leur identification ne prend de sens qu'à la lumière d'une activité transcriptionnelle différente de Tbx4 et Tbx5 et de son importance dans la détermination de l'identité.

L'argumentation présentée jusqu'ici pour expliquer la différence d'activité de Tbx4 et de Tbx5 dans l'identité est centrée sur une intervention différentielle sur des gènes partagés. Par contre, il faut aussi souligner l'existence d'éventuelles cibles spécifiques de Tbx4 qui pourraient expliquer son activité. En effet, nos résultats ne permettent pas d'exclure que les

innovations morphologiques caractéristiques de l'identité postérieure (en admettant que l'identité antérieure correspond à un état par défaut) soient dues à l'expression de gènes spécifiques au membres postérieurs, sous le contrôle de Tbx4. Une façon directe d'évaluer cette possibilité repose évidemment sur la comparaison des sites de liaisons de ces facteurs *in vivo*, tel que discuté précédemment. Alternativement, nous pourrions tester fonctionnellement cette hypothèse en tentant de compenser les pertes encourues par l'inactivation de *Pitx1* avec une chimère composée du domaine de liaison à l'ADN de Tbx5 flanquée des N- et C-terminus de Tbx4. Cette expérience pourrait confirmer/infirmer l'équivalence fonctionnelle des boîtes T de Tbx4 et Tbx5 et nous permettre d'évaluer la pertinence de notre modèle d'action de ces facteurs. Ceci étant, il ne faut tout de même pas oublier que l'invocation de marqueurs spécifiques des membres postérieurs, outre *Pitx1* et *Tbx4*, reste hypothétique et les expériences réalisées jusqu'ici n'ont pas permis d'identifier d'autres gènes avec une expression aussi restreinte dans les membres que ces facteurs. Nous pensons donc que les différences morphologiques corréleraient plutôt avec des modulations, locales, spécifiques de gènes communs à Tbx4 et Tbx5, d'où l'importance de la caractérisation de l'activité transcriptionnelle de ces facteurs.

### 6.3 Spécificité transcriptionnelle de Tbx4 et Tbx5

Les travaux détaillés dans le présent travail font état d'une activité dominante divergente pour les facteurs Tbx4 et Tbx5. D'une part, nous avons montré que Tbx4 et Tbx5 portent un domaine activateur qui semble corrélérer avec leur capacité à soutenir la croissance du membre. D'autre part, nous avons découvert un domaine répresseur spécifique à Tbx4. Ce dernier semble être capital pour permettre à Tbx4 de dicter les caractéristiques particulières de l'identité postérieure.

Il est intéressant de remarquer que ces résultats argumentent en faveur d'une nature modulaire des domaines activateurs et répresseurs de Tbx4, où le domaine répresseur semble dominant dans certains contextes, mais où il n'empêche pas l'activité du domaine activateur en l'absence de son ou ses co-répresseurs. Il faut aussi considérer l'importance de la présence d'autres partenaires transcriptionnels qui, sur des promoteurs particuliers, pourraient « sélectionner » l'activité prédominante de Tbx4. De plus, il est envisageable que certaines modifications post-traductionnelles soient nécessaires *in vivo* pour faire la balance entre les deux activités, notamment pour assurer la croissance appropriée du membre. Il serait donc intéressant de faire des études de protéomiques sur Tbx4 pour tenter de mettre en évidence ces modifications qui affecteraient, voire contrôlèrent, l'activité de Tbx4 notamment en affectant sa conformation et sa capacité à interagir avec certains de ses cofacteurs.

Nos résultats semblent contraster à prime abord avec ceux précédemment publiés (Koshiba-Takeuchi et al. 2006), où les auteurs ont pu mettre en évidence une activité positive équivalente pour *Tbx4* et *Tbx5*. Comme nous avons pu le démontrer dans cette thèse, ces résultats sont compatibles avec ceux montrés dans les chapitres 2 et 3. En effet, il apparaît évident que le contexte cellulaire dans lequel l'activité de *Tbx4* est évaluée influence grandement ses propriétés transcriptionnelles. De fait, les expériences présentées par Koshiba-Takeuchi et collègues sont réalisées dans les cellules C3H10T1/2, les mêmes cellules dans lesquelles nous n'avons aussi observé aucune différence entre *Tbx4* et *Tbx5*. De façon intéressante, l'apport exogène de *Prmt7* dans ces cellules confère spécifiquement à *Tbx4* une activité répressive semblable à celle observée dans les cultures primaires dérivées de membres postérieurs, posant bien le problème du rôle de la répression et de *Prmt7* dans la mise en place de l'identité.

#### **6.4 Tenants moléculaire de l'identité**

Contrairement à ce qui a été observé chez le poulet, la surexpression ectopique chez la souris de *Tbx4* et *Tbx5* ne suffit pas pour altérer l'identité des membres. Il ne faut pas oublier que cette conversion de l'identité est observée chez le poulet à une très faible fréquence (Takeuchi et al. 1999). En fait, seul *Pitx1* semble efficace pour conférer, autant chez le poulet que chez

la souris, une identité postérieure à un membre antérieur lors d'expressions ectopiques (Logan et Tabin 1999; DeLaurier et al. 2006). En tenant compte de la perte d'identité postérieure des mutants *Pitx1*, il semble évident que *Pitx1* est le gène en amont de l'identité des membres postérieurs (Fig. 6.1). Sachant que *Tbx4* est capable de restaurer l'identité aux membres postérieurs déficients en *Pitx1*, il semble envisageable que *Pitx1* convertisse l'identité du membre antérieur via l'induction de *Tbx4* (Logan et Tabin 1999; DeLaurier et al. 2006) en plus de facteurs qui permettent à *Tbx4* d'altérer l'identité antérieure, ce qui n'exclut pas une coopération entre *Pitx1* et *Tbx4* (Fig. 6.1). Cependant, la compensation observée dans les mutants *Pitx1* suggère la nécessité de cofacteurs à *Tbx4* et plus spécifiquement, l'induction d'un co-répresseur comme *Prmt7*, semble un prérequis pour valider ce modèle.

Pour tester ce modèle, nous avons envisagé deux types d'expériences. L'expérience la plus directe aurait été d'évaluer l'étendue des modifications induites par *Pitx1* dans les membres antérieurs des souris où *Tbx4* est inactivé conditionnellement (par exemple, chez les souris *Prx1-Pitx1*; *Tbx4*<sup>flox/flox</sup>; *Prx1-Cre*, pour s'affranchir de la létalité embryonnaire des mutants complets). Dans un tel contexte, notre modèle prédirait une perte de la modification de l'identité antérieure par *Pitx1*. N'ayant pas accès aux souris *Tbx4*<sup>flox/flox</sup>, nous avons plutôt eu recours à un paradigme expérimental alternatif pour tester notre modèle, soit la surexpression à la fois de *Tbx4* et du co-répresseur candidat, comme *Prmt7*, chez le poulet. En effet, à la lumière du faible pourcentage de conversion de l'identité antérieure par *Tbx4* dans

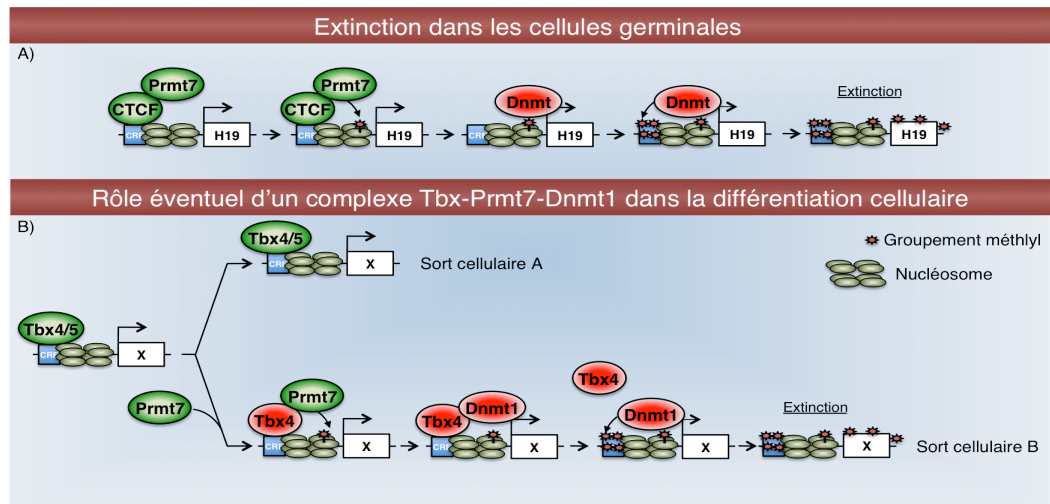
l'étude pionnière de Takeuchi et collègues, nous avons raisonné que l'activité de Prmt7, s'il s'avérait être le cofacteur essentiel de Tbx4, pourrait suffire à augmenter significativement l'efficacité de cette conversion Tbx4-dépendante. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de reproduire les résultats de l'étude initiale et nous n'avons donc pas pu évaluer par cette approche la validité de notre candidat et de notre modèle (Jean-François Ouimette, Antoine Simoneau, Jacques Drouin; données non publiées). Nous en sommes présentement à explorer le rôle de *Prmt7* dans les membres à l'aide de mutants conditionnels. En dépit de ceci, les résultats que nous avons obtenus nous permettent de penser que l'action de Prmt7 pourrait être au cœur de l'activité de Tbx4. Il est intrigant de constater l'importance de la répression transcriptionnelle dans l'acquisition de l'identité postérieure des membres, surtout si l'on considère que ceux-ci sont plus complexes que les antérieurs, dont ils seraient dérivés. Dans ce contexte, il est intéressant de spéculer sur comment nos travaux et ceux des autres s'accordent avec cette notion, qui pourtant semble contre-intuitive, et quels indices ils nous apportent sur le mécanisme qui ferait intervenir la fonction répressive dans la mise en place de l'identité postérieure.

On sait qu'un mécanisme de régulation épigénétique peut reposer sur l'ajout de groupements méthyles sur les lysines des histones, donnant lieu au code des histones qui fait référence aux différentes modifications et à leur impact sur l'état chromatinien et sur l'expression génomique. Par exemple, on trouve dans le génome de cellules naïves, des domaines bivalents, où à la



fois des régions sont marquées par des modifications répressives (H3K27me3) et activatrices (H3K4me3). Ces régions seraient effectivement celles ciblées par les régulateurs développementaux pour être activées/déréprimées dans un type cellulaire et plutôt éteintes/désactivées dans un autre. Sous cet angle, le processus de différenciation implique l'association de facteurs de transcription avec des protéines capable de réguler ces domaines bivalents. En s'associant avec Prmt7, Tbx4 pourrait fort bien appartenir à cette classe de régulateurs développementaux qui peuvent induire des modifications d'histones.

Les Prmt (*protein arginine methyltransferases*) sont aussi capables de méthyliser les histones et ces modifications d'histones ont été associées directement au remaniement de la structure nucléaire (Herrmann et al. 2004; Fackelmayer 2005; Herrmann et al. 2005) avec pour impact le recrutement de protéines à chromodomaine, avec un domaine Tudor ou encore les doigts PHD (Ruthenburg et al. 2007a; Ruthenburg et al. 2007b) pour diriger une éventuelle activation ou répression de la transcription (Meyer et al. 2007; Zhao et al. 2009a; Rank et al. 2010). Prmt7 est une arginine méthyltransférase de type II (Lee et al. 2005), qui entraîne une diméthylarginine symétrique (par opposition aux enzymes de type I où c'est asymétrique). Il est très pertinent de souligner que les enzymes de type II ont été associées avec des membres de la famille Dnmt (Jelinic et al. 2006; Zhao et al. 2009a), de laquelle nous avons pu isoler Dnmt1 comme protéine interagissant avec Tbx4. Cette famille de facteurs est impliquée dans la méthylation de l'ADN, une modification qui est



**Figure 6.4** Modèle proposé de détermination de l'identité à l'échelle cellulaire.

A) Le recrutement de Prmt7 par CTCF au locus H19 permet la méthylation dissymétrique des histones H2 et H4 (Jelinic et al. 2006). Cette marque chromatiniene recrute une activité Dnmt qui entraîne la méthylation des séquences régulatrices de H19 et éventuellement, l'extinction du locus. B) Le recrutement de Prmt7 par Tbx4 sur certaines cibles viendrait interférer à leur expression par un mécanisme similaire où, possiblement, l'interaction entre Dnmt1 et Tbx4 viendrait cibler l'extinction d'un locus particulier. Ce mécanisme pourrait influencer la morphogénèse du membre, en supposant que celui-ci gouverne l'expression de gènes critique dans la différenciation cellulaire. CRE; élément de régulation en cis.

notamment associée à l’empreinte, à l’inactivation du chromosome X, et aussi à l’extinction transcriptionnelle. Si Dnmt1 semble principalement impliqué dans la maintenance des patrons de méthylations lors de la réplication chromosomique (revu dans Chen et Li 2006), cette protéine a aussi été associée à l’ajout *de novo* de groupement méthyles (Feltus et al. 2003; Jair et al. 2006; Grandjean et al. 2007)

Plus de travaux seront nécessaires pour définir la signification de ces interactions et d’un possible complexe Tbx4-Prmt-Dnmt dans la régulation transcriptionnelle d’un sous-ensemble de gènes de Tbx4, mais les perspectives d’études qu’il offre sont très intéressantes. Par exemple, des travaux récents montrent que la régulation du locus de la  *$\beta$ -globine* foetale fait intervenir la méthylation symétrique de l’histone H4 (H4R3me2s) qui permet le recrutement de Dnmt3a et la méthylation génomique nécessaire à l’extinction (Rank et al. 2010). Sachant que le même type de mécanisme est déployé par Prmt7 sur le locus de H19 dans la mise en place de l’empreinte génomique (Jelinic et al. 2006), il est tentant de postuler l’existence d’un mécanisme de différenciation dans le développement du membre faisant intervenir un complexe Tbx4-Prmt-Dnmt. Celui-ci pourrait être impliqué dans la détermination de l’identité postérieure, via une influence particulière sur la destinée cellulaire, résultant dans la génération de membres sculptées différemment (Fig. 6.4). Dans ce contexte, l’activité répressive de Tbx4 pourrait retarder la différenciation cellulaire dans le membre, afin de générer une plus grande masse de cellules disponibles. Ce nombre supérieur de

cellules pourrait être suffisant pour interférer avec le déroulement « normal » (celui que l'on retrouve dans les membres antérieurs) de l'acquisition de l'identité positionnelle et par le fait même, cette perturbation des voies de signalisations dans les membres viendrait altérer la morphogénèse du membre (ten Berge et al. 2008). Cette hypothèse n'est pas triviale à tester mais aucun mutant actuellement disponible, hormis celui de *Pitx1*, ne présente de défauts d'identité lorsqu'on observe une perte de cellules dans les membres postérieurs, ce qui laisse à penser que la situation est plus complexe. Une action plus directe de la fonction répressive de *Tbx4* pourrait être requise sur les voies de différenciation importantes dans le membre et sur les promoteurs les régulant, par exemple sur *Sox9* ou sur *Scleraxis*, impliqué respectivement dans la formation des dérivés cartilagineux et dans les tendons. Les données d'immunoprécipitations de la chromatine devraient nous éclairer sur ce point.

#### **6.4 L'activité positive de *Tbx4* et le développement du membre**

La dualité de l'action transcriptionnelle de *Tbx4* pendant le développement des membres postérieurs est un aspect complètement nouveau et plus d'études seront nécessaires pour en comprendre sa régulation et ses impacts durant le développement. De façon primaire, il semble que l'activité transcriptionnelle répressive de *Tbx4* est requise pour l'identité, alors que son activité positive l'est pour la croissance. Comment ces activités sont-elles balancées dans une même cellule? Est-ce en fonction de

l'environnement chromatinien, de la combinaison locale de facteurs de transcription ou plus simplement en fonction de l'interaction avec certains cofacteurs? Et enfin, est-ce que l'activité répressive est requise pour la croissance du membre? Ces questions sont particulièrement pertinentes pour mieux déterminer comment *Tbx4* influence le développement du membre dans les différents dérivés du membre et en fonction des signaux morphogénétiques.

Les données disponibles sur les cascades signalétiques impliquées dans le développement du membre peuvent déjà laisser entrevoir certains candidats qui permettraient de déterminer l'activité prédominante de *Tbx4* dans un contexte donné. En effet, on sait que les cellules directement juxtaposées sous la crête apicale sont celles qui se divisent activement alors que celles qui progressivement sont éloignées de la crête sont plutôt dirigées vers la différenciation. Sachant que les *Fgf* de la crête (4, 8, 9, 17) sont perçus par les cellules subapicales, on peut facilement imaginer que la présence de ces facteurs dirige une activité positive pour les facteurs *Tbx4* et éventuellement *Tbx5*. L'éloignement de la crête, et conséquemment des signaux, pourrait permettre à *Tbx4* d'assurer sa fonction répressive. À cet effet, il est intrigant de constater qu'un des facteurs que nous avons identifié est la  $\beta$ -caténine; celle-ci a été décrite comme fonctionnant à titre de partenaire de *Tbx5* dans l'activation du promoteur de *Fgf10* (Agarwal et al. 2003). Nous n'avons pas poussé les recherches dans cette direction puisque nous nous sommes principalement concentrés sur les co-répresseurs, mais il

n'en demeure pas moins que cette interaction est inédite et qu'il serait pertinent de disséquer les tenants de celle-ci dans l'activation de *Fgf10* dans les membres postérieurs. Un autre facteur possiblement impliqué dans la modulation de l'activité de Tbx4 pourrait fort bien être Pitx1, dont nous connaissons le rôle dans la croissance et pour lequel nous avons détecté une présence sur un élément régulateur de la transcription de *Fgf10* (Fig 6.3).

Parmi les représentants majeurs ressortis du double hybride, notons la présence de plusieurs protéines de liaison à l'ARN (RNA binding protein; Chapitre 3). L'importance croissante de ces protéines dans la régulation de la structure nucléaire, dans la régulation de l'expression génique soit directement sur la transcription, sur la maturation des ARN messagers ou sur la stabilité de ceux-ci laisse penser que les interactions révélées sont porteuses d'une information utile quant à la biologie de Tbx4. Cependant, les approches pour tester ce genre de rôle sont plutôt limitées dans la mesure où nous ne disposons de cibles directes de Tbx4, ni de lignée cellulaire établie où Tbx4 est exprimée. Nonobstant, la poursuite des travaux sur les cibles des Tbx pourrait nourrir d'éventuelles expériences sur la fonction des complexes Tbx-*RNA-binding protein*.

### 6.5 Activité transcriptionnelle ancestrale de Tbx4/5

Il est aussi important de souligner que les propriétés transcriptionnelles de Tbx4 et Tbx5 semblent avoir divergé durant l'évolution. En effet, nous avons pu mettre en évidence l'absence de fonction répressive d'un Tbx4/5 ancestral, dérivé de l'amphioxus. Ceci laisse entrevoir un modèle pour l'acquisition de l'identité au cours de l'évolution. Des travaux antérieurs, basés sur l'observation de fossiles, ont suggéré soit une apparition, au niveau antérieur, des membres, soit une restriction simultanée, du potentiel de formation des membres, à des positions fixes antérieures et postérieures. En dépit d'absences importantes de données dans l'arbre phylogénétique, dues au manque dans la collection de fossiles disponibles pour certaines périodes, le fin mot de l'histoire de l'émergence et de l'évolution des tétrapodes n'est pas connu. Cependant, à la lumière de nos résultats, il apparaît qu'une grande partie des caractéristiques des membres postérieurs est imputable à l'activité (répressive) de Tbx4. S'il est périlleux de favoriser l'apparition de cette fonction durant l'évolution ou encore la perte de celle-ci dans Tbx5 et dans le représentant ancestral *AmphiTbx4/5*, il sera intéressant de caractériser la présence de cette fonction dans d'autres organismes.

Enfin, cette fonction répressive de Tbx4 est-elle impliquée dans la régulation de la croissance du membre? Une des données obtenues avec les différents transgènes soulève l'efficacité supérieure de Tbx4 pour restaurer la croissance du membre postérieur. Bien que ceci puisse être relié à un biais

expérimental, il demeure possible que Tbx4, via son domaine répresseur ou à travers un autre domaine spécifique, soit plus compétent pour soutenir la croissance du bourgeon ou des éléments squelettiques. L'inactivation de la fonction répressive, via la mutation Q538R, semble supporter l'implication du domaine répresseur dans la croissance. De plus, la surexpression d'une chimère superactive de Tbx4, où le C-terminal de Tbx4 est remplacé par VP16, n'est pas aussi compétente dans l'activation de *Fgf10*, suggérant encore une fois que l'activité répressive de Tbx4 est impliquée dans la croissance (Fig 6.3).

Les parties précédentes de la discussion ont traité de l'importance de l'activité transcriptionnelle de Tbx4 dans l'identité et dans la croissance. La dissection des activités de Tbx4 n'aurait pas été possible sans les mutants *Pitx1*. Il est donc intéressant de revenir un pas en arrière et d'évaluer nos résultats relativement à l'objectif de départ; comprendre les tenants de la fonction de Pitx1 dans les membres postérieurs.

## 6.6 Programme en aval de Pitx1

La question fondamentale qui s'imposait au départ de ce travail était : qu'est-ce qui permet d'établir une identité différentielle? Pour répondre à cette question, une analyse du transcriptome des mutants *Pitx1* avait été entreprise et avait révélé peu de gènes dérégulés (Marcil et Drouin, 2000, données non publiées). Parmi ceux-ci, on retrouve en tête de liste *Tbx4*, dont l'expression



est fortement diminuée. Nous nous sommes donc attardés à ce gène et les travaux présentés nous ont permis de mettre en évidence une activité essentielle de *Tbx4* dans la mise en place de l'identité postérieure.

Cette relation, qui apparaît maintenant plus précisément chez la souris, trouve aussi des échos chez l'humain. En effet, deux récentes publications font état de mutations indépendantes dans les gènes *TBX4* et *PITX1* associées au pied bot varus équin, une condition qui se manifeste principalement à des malformations du pied (Gurnett et al. 2008; Alvarado et al. 2010). De fait, les malformations se présentent le plus souvent sous la forme d'un pied dans une position aberrante, où la plante du pied n'est plus orientée vers le sol. Chez les patients investigués, des défauts au niveau du tibia et du calcanéum, mais aussi sur l'ilium et la symphyse pubienne sont présents, défauts qui ne sont pas sans rappeler le phénotype des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup> et qui sont corrigés par *Tbx4* (Ouimette et al. 2010). Ces données supportent plus encore le lien entre *Pitx1* et *Tbx4* et renforcent l'idée que *Tbx4* pourrait jouer un rôle prédominant en aval de *Pitx1*.

Il serait par contre réducteur de penser que l'apport de *Pitx1* se résume entièrement à *Tbx4*. Si nous avons pu démontrer sans ambiguïté dans ce travail que *Tbx4* est une cible critique pour l'identité postérieure en aval de *Pitx1*, on peut maintenant supposer qu'il y en existe d'autres, dont l'expression et l'activité seraient directement dépendantes de *Pitx1*. En effet, la réintroduction de *Tbx4* ne compense pas complètement le phénotype des mutants *Pitx1*; entre autres, nous avons observé une récupération incomplète

de la morphologie du genou, du ratio entre la taille du tibia et du péroné ainsi qu'une quasi-absence de la récupération de la croissance de l'autopode. Il apparaît vraisemblable que certaines de ces caractéristiques ne soient pas compensées en raison d'un biais technique dans la stratégie de surexpression. Ceci étant, il apparaît tout aussi raisonnable de postuler la nécessité d'autres cibles en aval de *Pitx1* pour compenser plus encore son absence (Fig. 6.2).

Parmi les approches à envisager pour identifier ces autres cibles, il faut évidemment songer à établir de nouveau le transcriptome des membres mutants. Les données présentement disponibles ont été générées sur les premières plateformes de micropuces; les nouvelles générations de micropuces sont non seulement plus fiables, mais en plus elles offrent une représentativité beaucoup plus grande des transcrits exprimés chez la souris. La difficulté de l'approche réside cependant dans le choix du stade embryonnaire pour entreprendre cette expérience. On sait en effet que les facteurs de transcription *Pitx1* et *Pitx2* collaborent pour la formation des membres postérieurs. Cette collaboration semble se dérouler très tôt dans le développement embryonnaire puisque la seule co-expression a été révélée aux stades 9 à 15 somites dans la lame latérale postérieure, chez la souris. Par ailleurs, la perte de croissance, observable chez les mutants *Pitx1* par la perte du compartiment antérieur du bourgeon précoce (Marcil et al. 2003), est présente dès l'initiation de la croissance du bourgeon ce qui indique que certains des évènements détectables dans le bourgeon pourraient en fait être

secondaires à l'absence précoce de *Pitx1*. L'autre subtilité réside dans l'hétérogénéité du phénotype des membres entre les embryons, mais aussi entre les membres gauches et droits (Marcil et al. 2003), qui est vraisemblablement attribuable à cette compensation partielle de *Pitx2* et qui pourrait masquer de petites, mais significatives et importantes différences. L'utilisation des nouvelles technologies, beaucoup plus sensibles, pour établir les transcriptomes des mutants pourrait permettre de contourner ce problème en évitant d'avoir recours à des échantillons groupés. En résumé, l'utilisation combinée des techniques proposées offre la meilleure opportunité pour explorer les événements en aval de *Pitx1*.

### **6.7 Approche biaisée du rôle de *Pitx1* indépendant de *Tbx4* dans la mise en place de l'identité**

Les dernières années nous ont apporté de nombreuses analyses de mutants murins dans lesquels le développement des membres est perturbé. Il est donc invitant de chercher les similitudes entre le phénotype de ces mutants et des mutants *Pitx*. Parmi les gènes dont l'inactivation produit un phénotype semblable aux souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>; *Pitx2*<sup>neo/neo</sup>, on retrouve *Irx3* et *Irx5*. Les souris *Irx3*<sup>-/-</sup>; *Irx5*<sup>-/-</sup> présentent une forte perturbation de la croissance des membres postérieurs (Chi-Chung Hui, communication personnelle) et nous avons évidemment cherché au laboratoire à établir une corrélation entre ces gènes et les *Pitx* (Marisol Lavertu Jolin, mémoire de maîtrise 2009). Nous

n'avons pu établir de lien direct entre ces voies génétiques, mais nous avons tout de même pu mettre en évidence une diminution d'expression de *Pax9* dans ces deux doubles mutants. De façon intéressante, la simple inactivation de *Pitx1* suffit pour retarder l'expression de *Pax9* dans le membre postérieur. Si l'inactivation de *Pax9* seule est difficilement réconciliable avec les phénotypes observés, celle-ci produisant un excès de cartilage au niveau du genou notamment, il n'en demeure pas qu'il s'agit d'un indice intéressant pour creuser un lien éventuel entre *Pax9* et les *Pitx1*, et même *Tbx4*. Parmi les voies contrôlant l'expression de *Pax9*, mentionnons les *Fgf*, qui activent son expression dans l'ectoderme oral (Neubuser et al. 1997; Mandler et Neubuser 2001), les *Bmp*, dont l'activité ectopique empêche l'expression dans les membres (Hofmann et al. 1998; McGlinn et al. 2005) et *Shh*, qui bloque l'expression de *Pax9* dans le domaine postérieur via *Gli3* (McGlinn et al. 2005). Enfin, l'inactivation de *Pbx1* et *Pbx2* bloque aussi l'expression de *Pax9* dans le sclérotome et dans les membres (Capellini et al. 2008). Parmi ces voies, il est intéressant de mentionner que le laboratoire a précédemment montré que *Bmp7* était surpexprimé transitoirement à l'émergence du bourgeon de membres postérieurs des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup> (Alexandre Marcil, Jacques Drouin; données non publiées). La description du mutant *Pitx1*<sup>-/-</sup>; *Pitx2*<sup>neo/neo</sup> a aussi montré un retard de l'expression des *Fgf* de la crête apicale et une perte de mésenchyme antérieur. Il appert donc qu'une possibilité pour expliquer certains défauts du mutant *Pitx1* est une dérégulation précoce de la voie Bmp. Par contre, si cette possibilité semble probable pour expliquer le

défaut de croissance observé, il est plus difficile de la réconcilier avec la perte d'éléments de l'identité postérieure.

Parmi les éléments affectés dans les membres postérieurs des souris *Pitx1*<sup>-/-</sup>, on note la diminution de la taille du tibia et sa perte avec l'inactivation subséquente de *Pitx2*, la perte de la rotule et du doigt #1, l'hallux. Si ces défauts ont été associés à un défaut des éléments antérieurs, la perte de la rotule semble suggérer non pas une perte unique des structures antérieures, mais en plus des défauts dans l'axe dorsoventral, la rotule étant un élément dorsal, tout comme le tibia tardivement dans l'embryogenèse. De plus, on constate parfois, en l'absence de *Pitx1*, la perte de la flexure dorsale spécifique du pied; ce dernier étant dans l'axe des os du zeugopode (Fig 1.5). Ce phénotype est similaire à celui observé en l'absence conditionnelle de *Lmx1b*, effecteur essentiel pour la spécification dorsale, dans les souris *Prx1-Cre; Lmx1b*<sup>flox/flox</sup>; ces souris perdent la rotule et ont un autopode qui est dans la continuité du zeugopode (Chen et al. 1998). Parmi les autres caractéristiques communes, on retrouve dans les deux cas un aplatissement du péroné (absence de la courbure dorsale) et un retard de condensation osseuse dans les os tarsiens du talon, le calcanéum et l'astragale ("Zucker's node"; Szeto et al. 1999). Enfin, les syndromes humains où des mutations ont été trouvées dans *LMX1B*, l'onxycho-osteo-dysplasie héréditaire (OMIM 161200), et dans *TBX4*, pour le syndrome coxo-podo-patellaire, partagent plusieurs caractéristiques, notamment au niveau du phénotype de la rotule et au niveau de la hanche (Bongers et al. 2002; Bongers et al. 2004; Abdul-

Rahman et al. 2006). Dans cette perspective, il serait pertinent de caractériser les différentes molécules responsables de la polarité D-V dans le mutant *Pitx1*.

Un autre aspect intéressant de la problématique du rôle de *Pitx1* est dans la dynamique d'expression de ce facteur. Précisément, si l'on sait que son expression débute lors de la formation du mésoderme de la lame latéral postérieur, autour du jour embryonnaire 6.8 (Lanctôt et al. 1997), et qu'elle persiste au-delà du jour embryonnaire 14 dans le mésenchyme du membre (Alexandre Marcil, Aurore L'honoré et observations personnelles), on ne connaît pas l'ampleur de la fenêtre développementale où sa présence est requise pour le membre postérieur. Par exemple, si l'absence complète de *Tbx5* est incompatible avec le développement du membre antérieur, son inactivation après le stade précoce de bourgeon est presque sans conséquence (Hasson et al. 2007). Il serait *intéressant* de procéder au même genre d'étude avec différents mutants conditionnels de *Pitx1*, où l'on pourrait inactiver ce gène dans différents tissus et à différents stades. Cette approche pourrait aussi préciser un rôle tardif de *Pitx1* dans la croissance des os longs ((Lanctôt et al. 1999; Picard et al. 2007). De plus, elle permettrait d'outrepasser la létalité embryonnaire du mutant complet (Lanctôt et al. 1999).

## 6.8 Perspectives

En dépit des nombreux efforts déployés pour caractériser les différents rôles de *Tbx4*, *Tbx5* et *Pitx1* dans le développement du membre, beaucoup de travaux restent encore à faire pour véritablement comprendre comment ces facteurs influencent la formation de cette structure. Parallèlement, les mécanismes permettant de sculpter un organe ont conservé leurs parts de mystères qui sauront être révélés dans les années à venir. Déjà, la dissection génétique de la formation d'une structure aussi simple que la tubérosité deltoïde aura permis de mettre en relief le déploiement local du programme de formation de crête osseuse (Blitz et al. 2009). De plus, l'influence des tissus entre eux semble critique pour maintenir la destinée des cellules du membre, tel que montré chez certains mutants murins dépourvus de contraction musculaire où le sort des cellules des joints n'est pas maintenu (Kahn et al. 2009).

Pourquoi ces programmes se mettent-ils en place précisément à un endroit pendant l'embryogenèse? Quels sont les facteurs impliqués en amont pour déterminer ces emplacements? Comment une cellule d'un tissu donné perçoit-elle son environnement? Ces questions sont fondamentales pour comprendre la formation de structures complexes comme les membres. Les résultats obtenus dans cette thèse et par d'autres permettent de croire que *Tbx4* et *Tbx5* sont effectivement des joueurs importants dans l'organisation des masses musculaires et dans la formation morphologique des os des membres (Chapitre 2; Hasson et al. 2010). La caractérisation de leurs

partenaires, de leurs modifications post-traductionnelles ainsi que de leurs cibles et mécanisme transcriptionnels durant le développement est susceptible de nous fournir des indices sur les cascades impliquées dans la morphogénèse de ces appendices.



## Chapitre 7

## Chapitre 7: Références

Abdul-Rahman, OA, La, TH, Kwan, A, Schlaubitz, S, Barsh, GS, Enns, GM and Hudgins, L (2006). "Genitopatellar syndrome: expanding the phenotype and excluding mutations in LMX1B and TBX4." Am J Med Genet A **140**(14): 1567-1572.

Agarwal, P, Wylie, JN, Galceran, J, Arkhitko, O, Li, C, Deng, C, Grosschedl, R and Bruneau, BG (2003). "Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo." Development **130**(3): 623-633.

Agulnick, AD, Taira, M, Breen, JJ, Tanaka, T, Dawid, IB and Westphal, H (1996). "Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins." Nature **384**(6606): 270-272.

Agulnik, SI, Garvey, N, Hancock, S, Ruvinsky, I, Chapman, DL, Agulnik, I, Bollag, R, Papaioannou, V and Silver, LM (1996). "Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion." Genetics **144**(1): 249-254.

Ahn, D and Ho, RK (2008). "Tri-phasic expression of posterior Hox genes during development of pectoral fins in zebrafish: implications for the evolution of vertebrate paired appendages." Dev Biol **322**(1): 220-233.

Ahn, DG, Kourakis, MJ, Rohde, LA, Silver, LM and Ho, RK (2002). "T-box gene *tbx5* is essential for formation of the pectoral limb bud." Nature **417**(6890): 754-758.

Ahn, K, Mishina, Y, Hanks, MC, Behringer, RR and Crenshaw, EB, 3rd (2001). "BMP-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb." Development **128**(22): 4449-4461.

Akita, K (1996). "The effect of the ectoderm on the dorsoventral pattern of epidermis, muscles and joints in the developing chick leg: a new model." Anat Embryol (Berl) **193**(4): 377-386.

Alvarado, DM, Aferol, H, McCall, K, Huang, JB, Techy, M, Buchan, J, Cady, J, Gonzales, PR, Dobbs, MB and Gurnett, CA (2010). "Familial isolated clubfoot is associated with recurrent chromosome 17q23.1q23.2 microduplications containing *TBX4*." Am J Hum Genet **87**(1): 154-160.

Arman, E, Haffner-Krausz, R, Gorivodsky, M and Lonai, P (1999). "Fgfr2 is required for limb outgrowth and lung-branching morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11895-11899.

Barrow, JR, Thomas, KR, Boussadia-Zahui, O, Moore, R, Kemler, R, Capecchi, MR and McMahon, AP (2003). "Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge." Genes Dev **17**(3): 394-409.

Basu, S, Totty, NF, Irwin, MS, Sudol, M and Downward, J (2003). "Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis." Mol Cell **11**(1): 11-23.

Bell, SM, Schreiner, CM, Waclaw, RR, Campbell, K, Potter, SS and Scott, WJ (2003). "Sp8 is crucial for limb outgrowth and neuropore closure." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12195-12200.

Blitz, E, Viukov, S, Sharir, A, Shwartz, Y, Galloway, JL, Pryce, BA, Johnson, RL, Tabin, CJ, Schweitzer, R and Zelzer, E (2009). "Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction." Dev Cell **17**(6): 861-873.

Bongers, EM, Duijf, PH, van Beersum, SE, Schoots, J, Van Kampen, A, Burckhardt, A, Hamel, BC, Losan, F, Hoefsloot, LH, Yntema, HG, Knoers, NV and van Bokhoven, H (2004). "Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome." Am J Hum Genet **74**(6): 1239-1248.

Bongers, EM, Gubler, MC and Knoers, NV (2002). "Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings." Pediatr Nephrol **17**(9): 703-712.

Boogerd, KJ, Wong, LY, Christoffels, VM, Klarenbeek, M, Ruijter, JM, Moorman, AF and Barnett, P (2008). "Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43." Cardiovasc Res **78**(3): 485-493.

Bose, J, Grotewold, L and Ruther, U (2002). "Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3." Hum Mol Genet **11**(9): 1129-1135.

Boulet, AM, Moon, AM, Arenkiel, BR and Capecchi, MR (2004). "The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth." Dev Biol **273**(2): 361-372.

Bruneau, BG, Nemer, G, Schmitt, JP, Charron, F, Robitaille, L, Caron, S, Conner, DA, Gessler, M, Nemer, M, Seidman, CE and Seidman, JG (2001). "A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease." Cell **106**(6): 709-721.

Butz, NV, Campbell, CE and Gronostajski, RM (2004). "Differential target gene activation by TBX2 and TBX2VP16: evidence for activation domain-dependent modulation of gene target specificity." Gene **342**(1): 67-76.

Camarata, T, Bimber, B, Kulisz, A, Chew, TL, Yeung, J and Simon, HG (2006). "LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity." J Cell Biol **174**(3): 339-348.

Capellini, TD, Zewdu, R, Di Giacomo, G, Ascitti, S, Kugler, JE, Di Gregorio, A and Selleri, L (2008). "Pbx1/Pbx2 govern axial skeletal development by controlling Polycomb and Hox in mesoderm and Pax1/Pax9 in sclerotome." Dev Biol **321**(2): 500-514.

Carlson, H, Ota, S, Campbell, CE and Hurlin, PJ (2001). "A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome." Hum Mol Genet **10**(21): 2403-2413.

Caroll, RA (1988). Vertebrate Paleontology and Evolution. New York, W. H. Freeman and Company.

Carreira, S, Dexter, TJ, Yavuzer, U, Easty, DJ and Goding, CR (1998). "Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter." Mol Cell Biol **18**(9): 5099-5108.

Carrington, JL and Fallon, JF (1984). "The stages of flank ectoderm capable of responding to ridge induction in the chick embryo." J Embryol Exp Morphol **84**: 19-34.

Cebra-Thomas, JA, Bromer, J, Gardner, R, Lam, GK, Sheipe, H and Gilbert, SF (2003). "T-box gene products are required for mesenchymal induction of epithelial branching in the embryonic mouse lung." Dev Dyn **226**(1): 82-90.

Chan, YF, Marks, ME, Jones, FC, Villarreal, G, Jr., Shapiro, MD, Brady, SD, Southwick, AM, Absher, DM, Grimwood, J, Schmutz, J, Myers, RM, Petrov, D, Jonsson, B, Schluter, D, Bell, MA and Kingsley, DM (2010). "Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a Pitx1 enhancer." Science **327**(5963): 302-305.

Chapman, DL, Garvey, N, Hancock, S, Alexiou, M, Agulnik, SI, Gibson-Brown, JJ, Cebra-Thomas, J, Bollag, RJ, Silver, LM and Papaioannou, VE (1996). "Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development." Dev Dyn **206**(4): 379-390.

Charite, J, McFadden, DG and Olson, EN (2000). "The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development." Development **127**(11): 2461-2470.

Charles, MA, Suh, H, Hjalt, TA, Drouin, J, Camper, SA and Gage, PJ (2005). "PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation." Mol Endocrinol **19**(7): 1893-1903.

Chatelain (1820). "quoted by W. Roeckherath, The Nail-patella syndrome, Fortschr Geb Rontgenstr 75 (1951), pp. 700–704."

Chelsey, P (1935). "Development of the short-tailed mutant in the house mouse." J. Exp. Zool. **70**(3): 429-459.

Chen, H, Lun, Y, Ovchinnikov, D, Kokubo, H, Oberg, KC, Pepicelli, CV, Gan, L, Lee, B and Johnson, RL (1998). "Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome." Nat Genet **19**(1): 51-55.

Chen, T and Li, E (2006). "Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals." Curr Top Microbiol Immunol **301**: 179-201.



Chiang, C, Litingtung, Y, Harris, MP, Simandl, BK, Li, Y, Beachy, PA and Fallon, JF (2001). "Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function." Dev Biol **236**(2): 421-435.

Christoffels, VM, Habets, PE, Franco, D, Campione, M, de Jong, F, Lamers, WH, Bao, ZZ, Palmer, S, Biben, C, Harvey, RP and Moorman, AF (2000). "Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart." Dev Biol **223**(2): 266-278.

Coates, MI (1994). "The origin of vertebrate limbs." Dev Suppl: 169-180.

Coates, MI (2003). "The evolution of paired fins." Theory in Biosciences **122**(2-3): 266-287.

Coates, MI and Cohn, MJ (1998). "Fins, limbs, and tails: Outgrowths and axial patterning in vertebrate evolution." BioEssays **17**: 371-381.

Cohn, MJ, Izpisua-Belmonte, JC, Abud, H, Heath, JK and Tickle, C (1995). "Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos." Cell **80**(5): 739-746.

Cohn, MJ, Patel, K, Krumlauf, R, Wilkinson, DG, Clarke, JD and Tickle, C (1997). "Hox9 genes and vertebrate limb specification." Nature **387**(6628): 97-101.

Coll, M, Seidman, JG and Muller, CW (2002). "Structure of the DNA-bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome." Structure **10**(3): 343-356.

Cousin, J, Walbaum, R, Cegarra, P, Huguet, J, Louis, J, Pauli, A, Fournier, A and Fontaine, G (1982). "[Familial pelvi-scapular dysplasia with anomalies of the epiphyses, dwarfism and dysmorphism: a new syndrome? (author's transl)]." Arch Fr Pediatr **39**(3): 173-175.

Cretekos, CJ, Wang, Y, Green, ED, Martin, JF, Rasweiler, JJ and Behringer, RR (2008). "Regulatory divergence modifies limb length between mammals." Genes Dev **22**(2): 141-151.

Dahn, RD, Davis, MC, Pappano, WN and Shubin, NH (2007). "Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning." Nature **445**(7125): 311-314.

Darwin, C (1859). On the origin of the species by means of natural selection: or, The preservation of favoured races in the struggle for life. London, John Murray.

Davis, AP, Witte, DP, Hsieh-Li, HM, Potter, SS and Capecchi, MR (1995). "Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*." Nature **375**(6534): 791-795.

Delaurier, A, Burton, N, Bennett, M, Baldock, R, Davidson, D, Mohun, TJ and Logan, MP (2008). "The Mouse Limb Anatomy Atlas: an interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning." BMC Dev Biol **8**: 83.

DeLaurier, A, Schweitzer, R and Logan, M (2006). "Pitx1 determines the morphology of muscle, tendon, and bones of the hindlimb." Dev Biol **299**(1): 22-34.

Dobrzycka, KM, Kang, K, Jiang, S, Meyer, R, Rao, PH, Lee, AV and Oesterreich, S (2006). "Disruption of scaffold attachment factor B1 leads to TBX2 up-regulation, lack of p19ARF induction, lack of senescence, and cell immortalization." Cancer Res **66**(16): 7859-7863.

Dolle, P, Izpisua-Belmonte, JC, Falkenstein, H, Renucci, A and Duboule, D (1989). "Coordinate expression of the murine Hox-5 complex homoeobox-containing genes during limb pattern formation." Nature **342**(6251): 767-772.

Dudley, AT, Ros, MA and Tabin, CJ (2002). "A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development." Nature **418**(6897): 539-544.

Dvorak, L and Fallon, JF (1991). "Talpid2 mutant chick limb has anteroposterior polarity and altered patterns of programmed cell death." Anat Rec **231**(2): 251-260.

Echelard, Y, Epstein, DJ, St-Jacques, B, Shen, L, Mohler, J, McMahon, JA and McMahon, AP (1993). "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." Cell **75**(7): 1417-1430.

Fackelmayer, FO (2005). "A stable proteinaceous structure in the territory of inactive X chromosomes." J Biol Chem **280**(3): 1720-1723.

Fallon, JF, Lopez, A, Ros, MA, Savage, MP, Olwin, BB and Simandl, BK (1994). "FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development." Science **264**(5155): 104-107.

Farin, HF, Bussen, M, Schmidt, MK, Singh, MK, Schuster-Gossler, K and Kispert, A (2007). "Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors." J Biol Chem **282**(35): 25748-25759.

Feltus, FA, Lee, EK, Costello, JF, Plass, C and Vertino, PM (2003). "Predicting aberrant CpG island methylation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12253-12258.

Feng, G, Burton, N, Hill, B, Davidson, D, Kerwin, J, Scott, M, Lindsay, S and Baldock, R (2005). "JAtlasView: a Java atlas-viewer for browsing biomedical 3D images and atlases." BMC Bioinformatics **6**: 47.

Fernandez-Teran, M, Piedra, ME, Kathiriya, IS, Srivastava, D, Rodriguez-Rey, JC and Ros, MA (2000). "Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway." Development **127**(10): 2133-2142.

Fernandez-Teran, M, Piedra, ME, Ros, MA and Fallon, JF (1999). "The recombinant limb as a model for the study of limb patterning, and its application to muscle development." Cell Tissue Res **296**(1): 121-129.

Fernandez-Teran, M and Ros, MA (2008). "The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways." Int J Dev Biol **52**(7): 857-871.

Fernandez-Teran, MA, Hinchliffe, JR and Ros, MA (2006). "Birth and death of cells in limb development: a mapping study." Dev Dyn **235**(9): 2521-2537.

Force, A, Lynch, M, Pickett, FB, Amores, A, Yan, YL and Postlethwait, J (1999). "Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations." Genetics **151**(4): 1531-1545.

Freitas, R, Zhang, G and Cohn, MJ (2006). "Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates." Nature **442**(7106): 1033-1037.

Galceran, J, Farinas, I, Depew, MJ, Clevers, H and Grosschedl, R (1999). "Wnt3a<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in Lef1<sup>(-/-)</sup>Tcf1<sup>(-/-)</sup> mice." Genes Dev **13**(6): 709-717.

Ganan, Y, Macias, D, Duterque-Coquillaud, M, Ros, MA and Hurle, JM (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**(8): 2349-2357.

Georges, R, Nemer, G, Morin, M, Lefebvre, C and Nemer, M (2008). "Distinct expression and function of alternatively spliced Tbx5 isoforms in cell growth and differentiation." Mol Cell Biol **28**(12): 4052-4067.

Gibson-Brown, JJ, Agulnik, SI, Chapman, DL, Alexiou, M, Garvey, N, Silver, LM and Papaioannou, VE (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**(1-2): 93-101.

Gibson-Brown, JJ, Agulnik, SI, Silver, LM, Niswander, L and Papaioannou, VE (1998a). "Involvement of T-box genes Tbx2-Tbx5 in vertebrate limb specification and development." Development **125**(13): 2499-2509.

Gibson-Brown, JJ, S, IA, Silver, LM and Papaioannou, VE (1998b). "Expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 during chick organogenesis." Mech Dev **74**(1-2): 165-169.

Gluecksohn-Schoenheimer, S (1938). "The Development of Two Tailless Mutants in the House Mouse." Genetics **23**(6): 573-584.

Gorivodsky, M and Lonai, P (2003). "Novel roles of Fgfr2 in AER differentiation and positioning of the dorsoventral limb interface." Development **130**(22): 5471-5479.

Grandjean, V, Yaman, R, Cuzin, F and Rassoulzadegan, M (2007). "Inheritance of an epigenetic mark: the CpG DNA methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation." PLoS One **2**(11): e1136.

Greene, EC (1963). Anatomy of the rat. New York and London, Hafner Publishing Company.

Grieshammer, U, Minowada, G, Pisenti, JM, Abbott, UK and Martin, GR (1996). "The chick limbless mutation causes abnormalities in limb bud dorsal-ventral patterning: implications for the mechanism of apical ridge formation." Development **122**(12): 3851-3861.

Guha, U, Gomes, WA, Kobayashi, T, Pestell, RG and Kessler, JA (2002). "In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb." Dev Biol **249**(1): 108-120.

Guo, Q, Loomis, C and Joyner, AL (2003). "Fate map of mouse ventral limb ectoderm and the apical ectodermal ridge." Dev Biol **264**(1): 166-178.

Gurnett, CA, Alaei, F, Kruse, LM, Desruisseau, DM, Hecht, JT, Wise, CA, Bowcock, AM and Dobbs, MB (2008). "Asymmetric lower-limb malformations



in individuals with homeobox PITX1 gene mutation." Am J Hum Genet **83**(5): 616-622.

Haack, H and Gruss, P (1993). "The establishment of murine Hox-1 expression domains during patterning of the limb." Dev Biol **157**(2): 410-422.

Habets, PE, Moorman, AF, Clout, DE, van Roon, MA, Lingbeek, M, van Lohuizen, M, Campione, M and Christoffels, VM (2002). "Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation." Genes Dev **16**(10): 1234-1246.

Hamburger, V (1938). "Morphogenetic and axial self-differentiation of transplanted limb primordia of 2-day chick embryos. ." J. exp. Zool. **77**: 379-399.

Harfe, BD, Scherz, PJ, Nissim, S, Tian, H, McMahon, AP and Tabin, CJ (2004). "Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities." Cell **118**(4): 517-528.

Harrison, RG (1918). "Experiments on the development of the fore-limb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system." J. exp. Zool. **25**: 413-461.

Hashimoto, K, Yokouchi, Y, Yamamoto, M and Kuroiwa, A (1999). "Distinct signaling molecules control Hoxa-11 and Hoxa-13 expression in the muscle precursor and mesenchyme of the chick limb bud." Development **126**(12): 2771-2783.

Hasson, P, Del Buono, J and Logan, MP (2007). "Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth." Development **134**(1): 85-92.

Hasson, P, DeLaurier, A, Bennett, M, Grigorieva, E, Naiche, LA, Papaioannou, VE, Mohun, TJ and Logan, MP (2010). "Tbx4 and tbx5 acting in connective tissue are required for limb muscle and tendon patterning." Dev Cell **18**(1): 148-156.

Herrmann, F, Bossert, M, Schwander, A, Akgun, E and Fackelmayer, FO (2004). "Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1." J Biol Chem **279**(47): 48774-48779.

Herrmann, F, Lee, J, Bedford, MT and Fackelmayer, FO (2005). "Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1(PRMT1) in vivo." J Biol Chem **280**(45): 38005-38010.

Hill, P, Gotz, K and Ruther, U (2009). "A SHH-independent regulation of Gli3 is a significant determinant of anteroposterior patterning of the limb bud." Dev Biol **328**(2): 506-516.

Hill, TP, Taketo, MM, Birchmeier, W and Hartmann, C (2006). "Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning." Development **133**(7): 1219-1229.

Hinchliffe, JR and Ede, DA (1967). "Limb development in the polydactylous talpid3 mutant of the fowl." J. Embryol. exp. Morph. **17**: 385-404.

Hiroi, Y, Kudoh, S, Monzen, K, Ikeda, Y, Yazaki, Y, Nagai, R and Komuro, I (2001). "Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation." Nat Genet **28**(3): 276-280.

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**(2): 199-206.

Hong, JH, Hwang, ES, McManus, MT, Amsterdam, A, Tian, Y, Kalmukova, R, Mueller, E, Benjamin, T, Spiegelman, BM, Sharp, PA, Hopkins, N and Yaffe, MB (2005). "TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation." Science **309**(5737): 1074-1078.

Hornbruch, A and Wolpert, L (1970). "Cell division in the early growth and morphogenesis of the chick limb." Nature **226**(5247): 764-766.

Hui, CC and Joyner, AL (1993). "A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene." Nat Genet **3**(3): 241-246.

Humphry, GM (1872). Observations in myology. Cambridge and London, McMillan and Company.

Isaac, A, Rodriguez-Esteban, C, Ryan, A, Altabef, M, Tsukui, T, Patel, K, Tickle, C and Izpisua-Belmonte, JC (1998). "Tbx genes and limb identity in chick embryo development." Development **125**(10): 1867-1875.

Jacob, F (1977). "Evolution and tinkering." Science **196**(4295): 1161-1166.

Jacobs, JJ, Keblusek, P, Robanus-Maandag, E, Kristel, P, Lingbeek, M, Nederlof, PM, van Welsem, T, van de Vijver, MJ, Koh, EY, Daley, GQ and van Lohuizen, M (2000). "Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers." Nat Genet **26**(3): 291-299.

Jair, KW, Bachman, KE, Suzuki, H, Ting, AH, Rhee, I, Yen, RW, Baylin, SB and Schuebel, KE (2006). "De novo CpG island methylation in human cancer cells." Cancer Res **66**(2): 682-692.

Janvier, P and Clement, G (2010). "Palaeontology: Muddy tetrapod origins." Nature **463**(7277): 40-41.

Jelinic, P, Stehle, JC and Shaw, P (2006). "The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation." PLoS Biol **4**(11): e355.

Jerome-Majewska, LA, Jenkins, GP, Ernstoff, E, Zindy, F, Sherr, CJ and Papaioannou, VE (2005). "Tbx3, the ulnar-mammary syndrome gene, and Tbx2 interact in mammary gland development through a p19Arf/p53-independent pathway." Dev Dyn **234**(4): 922-933.

Johnson, DR (1967). "Extra-toes: anew mutant gene causing multiple abnormalities in the mouse." J Embryol Exp Morphol **17**(3): 543-581.

Julius, H (1885-1890). Meyers Konversations-Lexikon. Eine Encyklopädie des allgemeinen Wissens. 4. Meyers Konversations-Lexikon. B. Institut. Leipzig.

Jurand, A (1965). "Ultrastructural Aspects of Early Development of the Fore-Limb Buds in the Chick and the Mouse." Proc. R. Soc. Lond. B **162**: 387-405.

Kahn, J, Shwartz, Y, Blitz, E, Krief, S, Sharir, A, Breitel, DA, Rattenbach, R, Relaix, F, Maire, P, Rountree, RB, Kingsley, DM and Zelzer, E (2009). "Muscle contraction is necessary to maintain joint progenitor cell fate." Dev Cell **16**(5): 734-743.

Kawakami, Y, Capdevila, J, Buscher, D, Itoh, T, Rodriguez Esteban, C and Izpisua Belmonte, JC (2001). "WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo." Cell **104**(6): 891-900.

Kengaku, M, Capdevila, J, Rodriguez-Esteban, C, De La Pena, J, Johnson, RL, Izpisua Belmonte, JC and Tabin, CJ (1998). "Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud." Science **280**(5367): 1274-1277.

Khokha, MK, Hsu, D, Brunet, LJ, Dionne, MS and Harland, RM (2003). "Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning." Nat Genet **34**(3): 303-307.

Kieny, M (1960). "[Inductive role of the mesoderm in the early differentiation of the limb bud in the chick embryo.]." J Embryol Exp Morphol **8**: 457-467.

Kieny, M (1964a). "[Study of the Mechanism of Regulation in the Development of the Limb Buds of the Chick Embryo. I. Regulation of the Excess.]" Dev Biol **22**: 197-229.

Kieny, M (1964b). "[Study of the Mechanism of Regulation of Development of Limb Rudiments in the Chick Embryo. Ii. Regulation of Deficiencies in "Wing-Leg" and "Leg-Wing" Chimeras.]" J Embryol Exp Morphol **12**: 357-371.

Kieny, M, Mauger, A and Thevenet, A (1971). "[Influence of the axial nervous system on the morphogenesis of the limbs in the chick embryo]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **272**(1): 121-124.

Kispert, A and Herrmann, BG (1993). "The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein." EMBO J **12**(8): 3211-3220.

Kispert, A, Koschorz, B and Herrmann, BG (1995). "The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor." EMBO J **14**(19): 4763-4772.

Kmita, M, Tarchini, B, Zakany, J, Logan, M, Tabin, CJ and Duboule, D (2005). "Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function." Nature **435**(7045): 1113-1116.

Koshiya-Takeuchi, K, Takeuchi, JK, Arruda, EP, Kathiriya, IS, Mo, R, Hui, CC, Srivastava, D and Bruneau, BG (2006). "Cooperative and antagonistic interactions between Sall4 and Tbx5 pattern the mouse limb and heart." Nat Genet **38**(2): 175-183.

Krause, A, Zacharias, W, Camarata, T, Linkhart, B, Law, E, Lischke, A, Miljan, E and Simon, HG (2004). "Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development." Dev Biol **273**(1): 106-120.

Kuhlman, J and Niswander, L (1997). "Limb deformity proteins: role in mesodermal induction of the apical ectodermal ridge." Development **124**(1): 133-139.

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**(2): 421-433.

Lallemand, Y, Bensoussan, V, Cloment, CS and Robert, B (2009). "Msx genes are important apoptosis effectors downstream of the Shh/Gli3 pathway in the limb." Dev Biol **331**(2): 189-198.



Lallemand, Y, Nicola, MA, Ramos, C, Bach, A, Cloment, CS and Robert, B (2005). "Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development." Development **132**(13): 3003-3014.

Lamolet, B, Pulichino, AM, 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**(6): 849-859.

Lamonerie, T, Tremblay, JJ, Lanctôt, 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**(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**(14): 2807-2817.

Lanctôt, C, Moreau, A, Chamberland, M, Tremblay, ML and Drouin, J (1999). "Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene." Development **126**(9): 1805-1810.

Larkin, MA, Blackshields, G, Brown, NP, Chenna, R, McGettigan, PA, McWilliam, H, Valentin, F, Wallace, IM, Wilm, A, Lopez, R, Thompson, JD, Gibson, TJ and Higgins, DG (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.

Lausch, E, Hermanns, P, Farin, HF, Alanay, Y, Unger, S, Nikkel, S, Steinwender, C, Scherer, G, Spranger, J, Zabel, B, Kispert, A and Superti-Furga, A (2008). "TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome." Am J Hum Genet **83**(5): 649-655.

Lee, JH, Cook, JR, Yang, ZH, Mirochnitchenko, O, Gunderson, SI, Felix, AM, Herth, N, Hoffmann, R and Pestka, S (2005). "PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine." J Biol Chem **280**(5): 3656-3664.

Lee, JJ, von Kessler, DP, Parks, S and Beachy, PA (1992). "Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog." Cell **71**(1): 33-50.

Lee, TI, Rinaldi, NJ, Robert, F, Odom, DT, Bar-Joseph, Z, Gerber, GK, Hannett, NM, Harbison, CT, Thompson, CM, Simon, I, Zeitlinger, J, Jennings, EG, Murray, HL, Gordon, DB, Ren, B, Wyrick, JJ, Tagne, JB, Volkert, TL,

Fraenkel, E, Gifford, DK and Young, RA (2002). "Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **298**(5594): 799-804.

Lewandoski, M, Sun, X and Martin, GR (2000). "Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development." Nat Genet **26**(4): 460-463.

Li, QY, Newbury-Ecob, RA, Terrett, JA, Wilson, DI, Curtis, AR, Yi, CH, Gebuhr, T, Bullen, PJ, Robson, SC, Strachan, T, Bonnet, D, Lyonnet, S, Young, ID, Raeburn, JA, Buckler, AJ, Law, DJ and Brook, JD (1997). "Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family." Nat Genet **15**(1): 21-29.

Lingbeek, ME, Jacobs, JJ and van Lohuizen, M (2002). "The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator." J Biol Chem **277**(29): 26120-26127.

Logan, M, Martin, JF, Nagy, A, Lobe, C, Olson, EN and Tabin, CJ (2002). "Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer." Genesis **33**(2): 77-80.

Logan, M and Tabin, CJ (1999). "Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity." Science **283**(5408): 1736-1739.

Loomis, CA, Harris, E, Michaud, J, Wurst, W, Hanks, M and Joyner, AL (1996). "The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning." Nature **382**(6589): 360-363.

Lours, C and Dietrich, S (2005). "The dissociation of the Fgf-feedback loop controls the limbless state of the neck." Development **132**(24): 5553-5564.

Lu, P, Yu, Y, Perdue, Y and Werb, Z (2008). "The apical ectodermal ridge is a timer for generating distal limb progenitors." Development **135**(8): 1395-1405.

Lyons, I, Parsons, LM, Hartley, L, Li, R, Andrews, JE, Robb, L and Harvey, RP (1995). "Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5." Genes Dev **9**(13): 1654-1666.

MacCabe, JA, Blaylock, RL, Jr., Latimer, JL and Pharris, LJ (1991). "Fibroblast growth factor and culture in monolayer rescue mesoderm cells destined to die in the developing avian wing." J Exp Zool **257**(2): 208-213.

MacCabe, JA, Errick, J and Saunders, JW, Jr. (1974). "Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo." Dev Biol **39**(1): 69-82.

Mahmood, R, Bresnick, J, Hornbruch, A, Mahony, C, Morton, N, Colquhoun, K, Martin, P, Lumsden, A, Dickson, C and Mason, I (1995). "A role for FGF-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth." Curr Biol **5**(7): 797-806.

Maira, M, Couture, C, Le Martelot, G, Pulichino, AM, Bilodeau, S and Drouin, J (2003). "The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 co-activators and mediates hormone action." J Biol Chem **278**(47): 46523-46532.

Mandler, M and Neubuser, A (2001). "FGF signaling is necessary for the specification of the odontogenic mesenchyme." Dev Biol **240**(2): 548-559.

Marcil, A, Dumontier, E, Chamberland, M, Camper, SA and Drouin, J (2003). "Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds." Development **130**(1): 45-55.

Mariani, FV, Ahn, CP and Martin, GR (2008). "Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning." Nature **453**(7193): 401-405.

Marigo, V, Johnson, RL, Vortkamp, A and Tabin, CJ (1996). "Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development." Dev Biol **180**(1): 273-283.

Martin, GR (1998). "The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs." Genes Dev **12**(11): 1571-1586.

Masuya, H, Sagai, T, Wakana, S, Moriwaki, K and Shiroishi, T (1995). "A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants." Genes Dev **9**(13): 1645-1653.

McFadden, DG, McAnally, J, Richardson, JA, Charite, J and Olson, EN (2002). "Misexpression of dHAND induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding." Development **129**(13): 3077-3088.

McGlenn, E, van Bueren, KL, Fiorenza, S, Mo, R, Poh, AM, Forrest, A, Soares, MB, Bonaldo Mde, F, Grimmond, S, Hui, CC, Wainwright, B and Wicking, C (2005). "Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development." Mech Dev **122**(11): 1218-1233.

McKinnell, IW, Ishibashi, J, Le Grand, F, Punch, VG, Addicks, GC, Greenblatt, JF, Dilworth, FJ and Rudnicki, MA (2008). "Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex." Nat Cell Biol **10**(1): 77-84.

Meissner, A, Mikkelsen, TS, Gu, H, Wernig, M, Hanna, J, Sivachenko, A, Zhang, X, Bernstein, BE, Nusbaum, C, Jaffe, DB, Gnirke, A, Jaenisch, R and Lander, ES (2008). "Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells." Nature **454**(7205): 766-770.

Menke, DB, Guenther, C and Kingsley, DM (2008). "Dual hindlimb control elements in the Tbx4 gene and region-specific control of bone size in vertebrate limbs." Development **135**(15): 2543-2553.

Mercader, N, Leonardo, E, Piedra, ME, Martinez, AC, Ros, MA and Torres, M (2000). "Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes." Development **127**(18): 3961-3970.

Meyer, R, Wolf, SS and Obendorf, M (2007). "PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **107**(1-2): 1-14.

Mic, FA, Sirbu, IO and Duester, G (2004). "Retinoic acid synthesis controlled by Raldh2 is required early for limb bud initiation and then later as a proximodistal signal during apical ectodermal ridge formation." J Biol Chem **279**(25): 26698-26706.

Michaud, JL, Lapointe, F and Le Douarin, NM (1997). "The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure." Development **124**(8): 1453-1463.

Miller, SA, Huang, AC, Miazgowicz, MM, Brassil, MM and Weinmann, AS (2008). "Coordinated but physically separable interaction with H3K27-demethylase and H3K4-methyltransferase activities are required for T-box protein-mediated activation of developmental gene expression." Genes Dev **22**(21): 2980-2993.

Min, H, Danilenko, DM, Scully, SA, Bolon, B, Ring, BD, Tarpley, JE, DeRose, M and Simonet, WS (1998). "Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless." Genes Dev **12**(20): 3156-3161.

Minguillon, C, Del Buono, J and Logan, MP (2005). "Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth." Dev Cell **8**(1): 75-84.

Minguillon, C, Gibson-Brown, JJ and Logan, MP (2009). "Tbx4/5 gene duplication and the origin of vertebrate paired appendages." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21726-21730.



Moczek, AP and Rose, DJ (2009). "Differential recruitment of limb patterning genes during development and diversification of beetle horns." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(22): 8992-8997.

Mohler, J and Vani, K (1992). "Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*." Development **115**(4): 957-971.

Moon, AM, Boulet, AM and Capecchi, MR (2000). "Normal limb development in conditional mutants of *Fgf4*." Development **127**(5): 989-996.

Moon, AM and Capecchi, MR (2000). "*Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs." Nat Genet **26**(4): 455-459.

Mukhopadhyay, M, Shtrom, S, Rodriguez-Esteban, C, Chen, L, Tsukui, T, Gomer, L, Dorward, DW, Glinka, A, Grinberg, A, Huang, SP, Niehrs, C, Izpisua Belmonte, JC and Westphal, H (2001). "*Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse." Dev Cell **1**(3): 423-434.

Muller, CW and Herrmann, BG (1997). "Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor." Nature **389**(6653): 884-888.

Murakami, M, Nakagawa, M, Olson, EN and Nakagawa, O (2005). "A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18034-18039.

Naiche, LA and Papaioannou, VE (2003). "Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois." Development **130**(12): 2681-2693.

Naiche, LA and Papaioannou, VE (2007). "Tbx4 is not required for hindlimb identity or post-bud hindlimb outgrowth." Development **134**(1): 93-103.

Narita, T, Nishimatsu, S, Wada, N and Nohno, T (2007). "A Wnt3a variant participates in chick apical ectodermal ridge formation: distinct biological activities of Wnt3a splice variants in chick limb development." Dev Growth Differ **49**(6): 493-501.

Narita, T, Sasaoka, S, Udagawa, K, Ohyama, T, Wada, N, Nishimatsu, S, Takada, S and Nohno, T (2005). "Wnt10a is involved in AER formation during chick limb development." Dev Dyn **233**(2): 282-287.

Nelson, CE, Morgan, BA, Burke, AC, Laufer, E, DiMambro, E, Murtaugh, LC, Gonzales, E, Tessarollo, L, Parada, LF and Tabin, C (1996). "Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud." Development **122**(5): 1449-1466.

Neubuser, A, Peters, H, Balling, R and Martin, GR (1997). "Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation." Cell **90**(2): 247-255.

Ng, JK, Kawakami, Y, Buscher, D, Raya, A, Itoh, T, Koth, CM, Rodriguez Esteban, C, Rodriguez-Leon, J, Garrity, DM, Fishman, MC and Izpisua Belmonte, JC (2002). "The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10." Development **129**(22): 5161-5170.

Niederreither, K, McCaffery, P, Drager, UC, Chambon, P and Dolle, P (1997). "Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development." Mech Dev **62**(1): 67-78.

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**(15): 3563-3574.

Niedzwiedzki, G, Szrek, P, Narkiewicz, K, Narkiewicz, M and Ahlberg, PE (2010). "Tetrapod trackways from the early Middle Devonian period of Poland." Nature **463**(7277): 43-48.

Niemann, S, Zhao, C, Pascu, F, Stahl, U, Aulepp, U, Niswander, L, Weber, JL and Muller, U (2004). "Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family." Am J Hum Genet **74**(3): 558-563.

Niswander, L and Martin, GR (1992). "Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse." Development **114**(3): 755-768.

Niswander, L, Tickle, C, Vogel, A, Booth, I and Martin, GR (1993). "FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb." Cell **75**(3): 579-587.

Ohuchi, H, Nakagawa, T, Yamamoto, A, Araga, A, Ohata, T, Ishimaru, Y, Yoshioka, H, Kuwana, T, Nohno, T, Yamasaki, M, Itoh, N and Noji, S (1997). "The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor." Development **124**(11): 2235-2244.

Ohuchi, H, Nakagawa, T, Yamauchi, M, Ohata, T, Yoshioka, H, Kuwana, T, Mima, T, Mikawa, T, Nohno, T and Noji, S (1995). "An additional limb can be induced from the flank of the chick embryo by FGF4." Biochem Biophys Res Commun **209**(3): 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**(1): 51-60.

Ouimette, J-F, Jolin, ML, L'honoré, A, Gifuni, A and Drouin, J (2010). "Divergent transcriptional activities determine limb identity." Nature Communications **1**: 1-9.

Pajni-Underwood, S, Wilson, CP, Elder, C, Mishina, Y and Lewandoski, M (2007). "BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling." Development **134**(12): 2359-2368.

Parr, BA and McMahon, AP (1995). "Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb." Nature **374**(6520): 350-353.

Pautou, MP and Kieny, M (1973). "[Ecto-mesodermic interaction in the establishment of dorso-ventral polarity in the chick embryo foot]." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **277**(13): 1225-1228.

Paxton, C, Zhao, H, Chin, Y, Langner, K and Reecy, J (2002). "Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription." Gene **283**(1-2): 117-124.

Pflugfelder, GO, Roth, H and Poeck, B (1992a). "A homology domain shared between Drosophila optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding." Biochem Biophys Res Commun **186**(2): 918-925.

Pflugfelder, GO, Roth, H, Poeck, B, Kerscher, S, Schwarz, H, Jonschker, B and Heisenberg, M (1992b). "The lethal(1)optomotor-blind gene of Drosophila melanogaster is a major organizer of optic lobe development: isolation and characterization of the gene." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1199-1203.

Picard, C, Azeddine, B, Moldovan, F, Martel-Pelletier, J and Moreau, A (2007). "New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis." Clin Orthop Relat Res **462**: 59-66.

Pinson, KI, Brennan, J, Monkley, S, Avery, BJ and Skarnes, WC (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." Nature **407**(6803): 535-538.

Pizette, S and Niswander, L (1999). "BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge." Development **126**(5): 883-894.

Pulichino, AM, Vallette-Kasic, S, Couture, C, Gauthier, Y, Brue, T, David, M, Malpuech, G, Deal, C, Van Vliet, G, De Vroede, M, Riepe, FG, Partsch, CJ, Sippell, WG, Berberoglu, M, Atasay, B and Drouin, J (2003). "Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency." Genes Dev **17**(6): 711-716.

Putnam, NH, Butts, T, Ferrier, DE, Furlong, RF, Hellsten, U, Kawashima, T, Robinson-Rechavi, M, Shoguchi, E, Terry, A, Yu, JK, Benito-Gutierrez, EL, Dubchak, I, Garcia-Fernandez, J, Gibson-Brown, JJ, Grigoriev, IV, Horton, AC, de Jong, PJ, Jurka, J, Kapitonov, VV, Kohara, Y, Kuroki, Y, Lindquist, E, Lucas, S, Osoegawa, K, Pennacchio, LA, Salamov, AA, Satou, Y, Sauka-Spengler, T, Schmutz, J, Shin, IT, Toyoda, A, Bronner-Fraser, M, Fujiyama, A, Holland, LZ, Holland, PW, Satoh, N and Rokhsar, DS (2008). "The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype." Nature **453**(7198): 1064-1071.

Rallis, C, Bruneau, BG, Del Buono, J, Seidman, CE, Seidman, JG, Nissim, S, Tabin, CJ and Logan, MP (2003). "Tbx5 is required for forelimb bud formation and continued outgrowth." Development **130**(12): 2741-2751.

Rallis, C, Del Buono, J and Logan, MP (2005). "Tbx3 can alter limb position along the rostrocaudal axis of the developing embryo." Development **132**(8): 1961-1970.

Rancourt, DE, Tsuzuki, T and Capecchi, MR (1995). "Genetic interaction between hoxb-5 and hoxb-6 is revealed by nonallelic noncomplementation." Genes Dev **9**(1): 108-122.

Rank, G, Cerruti, L, Simpson, RJ, Moritz, RL, Jane, SM and Zhao, Q (2010). "Identification of a PRMT5-dependent repressor complex linked to silencing of human fetal globin gene expression." Blood.

Riddle, RD, Johnson, RL, Laufer, E and Tabin, C (1993). "Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA." Cell **75**(7): 1401-1416.

Rodriguez-Esteban, C, Tsukui, T, Yonei, S, Magallon, J, Tamura, K and Izpisua Belmonte, JC (1999). "The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity." Nature **398**(6730): 814-818.



Romer, AS (1966). Vertebrate paleontology. Chicago.

Ros, MA, Lyons, G, Kosher, RA, Upholt, WB, Coelho, CN and Fallon, JF (1992). "Apical ridge dependent and independent mesodermal domains of GHox-7 and GHox-8 expression in chick limb buds." Development **116**(3): 811-818.

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**(8): 1333-1344.

Rowe, DA, Cairns, JM and Fallon, JF (1982). "Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal." Dev Biol **93**(1): 83-91.

Rubin, L and Saunders, JW, 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**(1): 94-112.

Ruthenburg, AJ, Allis, CD and Wysocka, J (2007a). "Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark." Mol Cell **25**(1): 15-30.

Ruthenburg, AJ, Li, H, Patel, DJ and Allis, CD (2007b). "Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 983-994.

Ruvinsky, I and Gibson-Brown, JJ (2000). "Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution." Development **127**(24): 5233-5244.

Saito, D, Yonei-Tamura, S, Takahashi, Y and Tamura, K (2006). "Level-specific role of paraxial mesoderm in regulation of Tbx5/Tbx4 expression and limb initiation." Dev Biol **292**(1): 79-89.

Sakiyama, J, Yamagishi, A and Kuroiwa, A (2003). "Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development." Development **130**(7): 1225-1234.

Saunders, JW, JR and Gasseling, MT (1968). Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. Epithelial-Mesenchymal Interactions in Development. R. Fleishmajer. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins: 78-79.

Saunders, JW, Jr. (1948). "The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm." J Exp Zool **108**(3): 363-403.

Saunders, JW, Jr. and Reuss, C (1974). "Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo." Dev Biol **38**(1): 41-50.

Saunders, JWJ, Cairns, JM and Gasseling, MT (1957). "The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts of the chick." J. Morphol. **101**: 57-88.

Saunders, JWJ and Gasseling, MT (1959). "Effects of reorienting the wing-bud apex in the chick embryo " J. exp. Zool. **142**: 553-570.

Scherz, PJ, McGlinn, E, Nissim, S and Tabin, CJ (2007). "Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb." Dev Biol **308**(2): 343-354.

Schimmang, T, Lemaistre, M, Vortkamp, A and Ruther, U (1992). "Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt)." Development **116**(3): 799-804.

Schulte-Merker, S, Ho, RK, Herrmann, BG and Nusslein-Volhard, C (1992). "The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is

expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo."

Development **116**(4): 1021-1032.

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**(1): 138-141.

Selever, J, Liu, W, Lu, MF, Behringer, RR and Martin, JF (2004). "Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development." Dev Biol **276**(2): 268-279.

Shapiro, MD, Marks, ME, Peichel, CL, Blackman, BK, Nereng, KS, Jonsson, B, Schluter, D and Kingsley, DM (2004). "Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks." Nature **428**(6984): 717-723.

Shen, H, Wilke, T, Ashique, AM, Narvey, M, Zerucha, T, Savino, E, Williams, T and Richman, JM (1997). "Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds." Dev Biol **188**(2): 248-266.

Shubin, N, Tabin, C and Carroll, S (1997). "Fossils, genes and the evolution of animal limbs." Nature **388**(6643): 639-648.

Shubin, N, Tabin, C and Carroll, S (2009). "Deep homology and the origins of evolutionary novelty." Nature **457**(7231): 818-823.

Simon, HG, Kittappa, R, Khan, PA, Tsilfidis, C, Liversage, RA and Oppenheimer, S (1997). "A novel family of T-box genes in urodele amphibian limb development and regeneration: candidate genes involved in vertebrate forelimb/hindlimb patterning." Development **124**(7): 1355-1366.

Slack, JM (1991). "The nature of the mesoderm-inducing signal in *Xenopus*: a transfilter induction study." Development **113**(2): 661-669.

Sordino, P, van der Hoeven, F and Duboule, D (1995). "Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits." Nature **375**(6533): 678-681.

Soshnikova, N, Zechner, D, Huelsken, J, Mishina, Y, Behringer, RR, Taketo, MM, Crenshaw, EB, 3rd 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**(16): 1963-1968.

Stephens, TD, Beier, RL, Bringham, DC, Hiatt, SR, Prestridge, M, Pugmire, DE and Willis, HJ (1989). "Limbness in the early chick embryo lateral plate." Dev Biol **133**(1): 1-7.

Suh, H, Gage, PJ, Drouin, J and Camper, SA (2002). "Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification." Development **129**(2): 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**(3): 651-660.

Summerbell, D, Lewis, JH and Wolpert, L (1973). "Positional information in chick limb morphogenesis." Nature **244**(5417): 492-496.

Sun, X, Mariani, FV and Martin, GR (2002). "Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development." Nature **418**(6897): 501-508.

Szeto, DP, Rodriguez-Esteban, C, Ryan, AK, O'Connell, SM, Liu, F, Kioussi, C, Gleiberman, AS, Izpisua-Belmonte, JC and Rosenfeld, MG (1999). "Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development." Genes Dev **13**(4): 484-494.

Tabata, T, Eaton, S and Kornberg, TB (1992). "The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation." Genes Dev **6**(12B): 2635-2645.

Tabin, C and Laufer, E (1993). "Hox genes and serial homology." Nature **361**: 692-693.

Tabin, C and Wolpert, L (2007). "Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era." Genes Dev **21**(12): 1433-1442.

Takabatake, Y, Takabatake, T and Takeshima, K (2000). "Conserved and divergent expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 in Xenopus." Mech Dev **91**(1-2): 433-437.

Takeuchi, JK and Bruneau, BG (2009). "Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors." Nature **459**(7247): 708-711.

Takeuchi, JK, 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**(6730): 810-814.

Takeuchi, JK, 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**(12): 2729-2739.

Tanaka, M, Chen, Z, Bartunkova, S, Yamasaki, N and Izumo, S (1999a). "The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development." Development **126**(6): 1269-1280.

Tanaka, M, Wechsler, SB, Lee, IW, Yamasaki, N, Lawitts, JA and Izumo, S (1999b). "Complex modular cis-acting elements regulate expression of the cardiac specifying homeobox gene *Csx/Nkx2.5*." Development **126**(7): 1439-1450.

te Welscher, P, Fernandez-Teran, M, Ros, MA and Zeller, R (2002a). "Mutual genetic antagonism involving *GLI3* and *dHAND* prepatterns the vertebrate limb bud mesenchyme prior to *SHH* signaling." Genes Dev **16**(4): 421-426.

te Welscher, P, Zuniga, A, Kuijper, S, Drenth, T, Goedemans, HJ, Meijlink, F and Zeller, R (2002b). "Progression of vertebrate limb development through *SHH*-mediated counteraction of *GLI3*." Science **298**(5594): 827-830.

ten Berge, D, Brugmann, SA, Helms, JA and Nusse, R (2008). "Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development." Development **135**(19): 3247-3257.

Tickle, C (1981). "The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing." Nature **289**(5795): 295-298.



Tickle, C and Cole, NJ (2004). "Morphological diversity: taking the spine out of three-spine stickleback." Curr Biol **14**(11): R422-424.

Tickle, C, Summerbell, D and Wolpert, L (1975). "Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis." Nature **254**(5497): 199-202.

Todt, WL and Fallon, JF (1984). "Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud." J Embryol Exp Morphol **80**: 21-41.

Towers, M, Mahood, R, Yin, Y and Tickle, C (2008). "Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning." Nature **452**(7189): 882-886.

Treichel, D, Schock, F, Jackle, H, Gruss, P and Mansouri, A (2003). "mBtd is required to maintain signaling during murine limb development." Genes Dev **17**(21): 2630-2635.

True, JR and Carroll, SB (2002). "Gene co-option in physiological and morphological evolution." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 53-80.

Turner, BM (2007). "Defining an epigenetic code." Nat Cell Biol **9**(1): 2-6.

Tzchori, I, Day, TF, Carolan, PJ, Zhao, Y, Wassif, CA, Li, L, Lewandoski, M, Gorivodsky, M, Love, PE, Porter, FD, Westphal, H and Yang, Y (2009). "LIM homeobox transcription factors integrate signaling events that control three-dimensional limb patterning and growth." Development **136**(8): 1375-1385.

Vance, KW, Shaw, HM, Rodriguez, M, Ott, S and Goding, CR (2010). "The retinoblastoma protein modulates Tbx2 functional specificity." Mol Biol Cell **21**(15): 2770-2779.

Vargesson, N, Kostakopoulou, K, Drossopoulou, G, Papageorgiou, S and Tickle, C (2001). "Characterisation of *hoxa* gene expression in the chick limb bud in response to FGF." Dev Dyn **220**(1): 87-90.

Verheyden, JM and Sun, X (2008). "An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth." Nature **454**(7204): 638-641.

Vogel, A, Rodriguez, C and Izpisua-Belmonte, JC (1996). "Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb." Development **122**(6): 1737-1750.

Wagner, M, Thaller, C, Jessell, T and Eichele, G (1990). "Polarizing activity and retinoid synthesis in the floor plate of the neural tube." Nature **345**(6278): 819-822.

Wolpert, L (1969). "Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation." J Theor Biol **25**(1): 1-47.

Wolpert, L, Beddington, R, Brockes, J, Jessell, T, Lawrence, P and Meyerowitz, E (1998). Principles of Development. London, Current Biology Ltd.

Woltering, JM and Duboule, D (2010). "The origin of digits: expression patterns versus regulatory mechanisms." Dev Cell **18**(4): 526-532.

Woodger, JH (1945). On biological transformations. Growth and form. Essays presented to D'Arcy Thompson. M. P. Le Gros Clark WE, editors, Clarendon Press: 95–120.

Xu, X, Weinstein, M, Li, C, Naski, M, Cohen, RI, Ornitz, DM, Leder, P and Deng, C (1998). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction." Development **125**(4): 753-765.

Yashiro, K, Zhao, X, Uehara, M, Yamashita, K, Nishijima, M, Nishino, J, Saijoh, Y, Sakai, Y and Hamada, H (2004). "Regulation of retinoic acid

distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb." Dev Cell **6**(3): 411-422.

Yasuhiko, Y, Haraguchi, S, Kitajima, S, Takahashi, Y, Kanno, J and Saga, Y (2006). "Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(10): 3651-3656.

Yonei-Tamura, S, Endo, T, Yajima, H, Ohuchi, H, Ide, H and Tamura, K (1999). "FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos." Dev Biol **211**(1): 133-143.

Zaidi, SK, Sullivan, AJ, Medina, R, Ito, Y, van Wijnen, AJ, Stein, JL, Lian, JB and Stein, GS (2004). "Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription." EMBO J **23**(4): 790-799.

Zakany, J, Kmita, M and Duboule, D (2004). "A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry." Science **304**(5677): 1669-1672.

Zaragoza, MV, Lewis, LE, Sun, G, Wang, E, Li, L, Said-Salman, I, Feucht, L and Huang, T (2004). "Identification of the TBX5 transactivating domain and the nuclear localization signal." Gene **330**: 9-18.

Zhao, Q, Rank, G, Tan, YT, Li, H, Moritz, RL, Simpson, RJ, Cerruti, L, Curtis, DJ, Patel, DJ, Allis, CD, Cunningham, JM and Jane, SM (2009a). "PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing." Nat Struct Mol Biol **16**(3): 304-311.

Zhao, X, Sirbu, IO, Mic, FA, Molotkova, N, Molotkov, A, Kumar, S and Duester, G (2009b). "Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning." Curr Biol **19**(12): 1050-1057.

Zuniga, A, Haramis, AP, McMahon, AP and Zeller, R (1999). "Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds." Nature **401**(6753): 598-602.

Zwilling, E (1955). "Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud." J. Exp. Zool. **128**: 423-441.

Zwilling, E (1956a). "Interactions between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. I. Axis establishment." J. Exp. Zool. **132**: 157-172.

Zwilling, E (1956b). "Interactions between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. IV. Experiments with a wingless mutant." J. Exp. Zool. **132**: 241-253.

# **Annexe 1**

Le contenu de cette annexe est inclus dans cette thèse en raison du travail réalisé à titre de deuxième auteur. Ce manuscrit décrit l'action de la voie Bmp dans la régulation de la transcription du gène de la proopiomélanocortine (*Pomc*). Plus précisément, il est montré que Bmp4 réduit l'expression de *Pomc* via l'interférence de l'activité de l'hétérodimère Pitx/Tpit par les Smads, cibles de la signalisation Bmp. Cette découverte, en plus de révéler un mécanisme de régulation de l'expression du gène de la *Pomc*, suggère un rôle des Bmps dans le contrôle de la différenciation des cellules corticotropes de l'hypophyse. Ma contribution dans ce travail a permis de produire la figure 3E et les figures 4, 6 et 7. Ce manuscrit a été publié en mai 2005 dans la revue *Molecular Endocrinology* (**19**; 1329-42) (doi:10.1210/me.2004-0425) Copyright 2005 The Endocrine Society.

**Annexe 1: Bone Morphogenic Protein (Smad)-Mediated Repression of Proopiomelanocortin Transcription by Interference with Pitx/Tpit Activity**

Maria Nudi, Jean-François Ouimette and Jacques Drouin.

Laboratory of Molecular Genetics

Institut de recherches cliniques de Montréal

Montréal QC Canada H2W 1R7

\*Contact information: Jacques Drouin

Laboratoire de Génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110, avenue des Pins Ouest

Montréal Québec H2W 1R7

CANADA



**A1.1 Abstract :**

The signaling molecules bone morphogenic protein (BMP) 4 and 2 have been implicated in early organogenesis and cell differentiation of the pituitary. However, the use of different experimental paradigms has led to conflicting interpretations with regard to the action of these factors on differentiation of corticotroph cells and on expression of the proopiomelanocortin (POMC) gene. We have now directly assessed the action of BMP signaling on POMC expression and found that BMP4 represses POMC mRNA levels and promoter activity. This repression appears to be dependent on the classical BMP signaling pathway that involves the activin-like kinase 3/6 receptors and the Smad1/4 transcription factors. The repression is reversed by overexpression of the inhibitory Smads, Smad6 or Smad7. Collectively, the evidence suggests that autocrine BMP signaling may be acting upon AtT-20 cells to set the level of POMC expression. Upon BMP4 stimulation, activated phospho-Smad1 is recruited to the POMC promoter, where it apparently acts through interactions with the Pitx and Tpit transcription factors. It is postulated that these interactions interfere with the transcriptional activity of Pitx and/or Tpit, thus resulting in transcriptional repression.

## A1.2 Introduction

Bone Morphogenic Protein (BMP) factors belong to the TGF $\beta$  superfamily of multifunctional secretory peptides that regulate such diverse cellular responses as cell migration, adhesion, proliferation, differentiation, and death. Recently, transgenic and gene-deleted mice experiments have implicated BMP4 in the initial inductive phase of pituitary morphogenesis. The pituitary develops from a layer of competent oral ectoderm, Rathke's pouch (RP), that remains in contact with inducing neuroectoderm or ventral diencephalon throughout development. BMP4 is detected in the ventral diencephalon directly overlying the pituitary primordium; abrogation of this activity in BMP4 null (1) or Pitx1-Noggin transgenic mice (2) compromised initiation of RP formation. Neuroectodermal BMP4 signals are gradually lost as cellular proliferation and differentiation events are initiated in the glandular pituitary derived from RP. In parallel, BMP2 signals appear ventrally in the oral ectoderm as well as in surrounding mesenchyme, and together with dorsal fibroblast growth factor-8 signals, they have been proposed to establish pituitary cell fate-defining patterns of gene expression (2, 3).

Six distinct hormone-producing cell types arise in the developing pituitary: corticotrophs, gonadotrophs, lactotrophs, somatotrophs and thyrotrophs within the anterior lobe, and melanotrophs within the intermediate

lobe (4). The emergence of these distinct cell fates from a common primordium is coordinated by sets of transcription factors expressed in a precise spatiotemporal manner during pituitary organogenesis. The expression and activities of these transcription factors are thought to be specified early by extracellular signaling molecules such as BMP factors. In the case of gonadotroph differentiation, BMP2 has been shown to directly induce the expression of the GATA-2 zinc finger transcriptional activator of gonadotroph-specific LH and FSH gene expression (5). The role that BMP signaling might be playing in the establishment of corticotroph cell identity is presently unclear. Corticotroph cells distinguish themselves from other anterior pituitary cells by their expression of proopiomelanocortin (POMC) and ACTH starting at d 12.5 of development [embryonic day (e) 12.5], ACTH arising from the proteolytic maturation of POMC (6). ACTH expression in RP explants cultured in the presence of BMP2-expressing COS cells was significantly down-regulated (3); however, unaffected ACTH protein levels in the pituitaries of  $\alpha$ -glycoprotein hormone subunit-BMP4 transgenic mice (2) have argued against a negative role for BMP signals in the differentiation of corticotrophs.

As an initial approach toward elucidation of the role of BMP signaling in corticotroph differentiation, we studied regulation of POMC expression by BMP signaling pathways in the corticotroph AtT-20 cell line model. Previous analyses of the POMC (-480/+63 bp) gene promoter known to confer corticotroph-specific activity (7, 8) had implicated distal and central regulatory

elements in the maintenance of promoter activity (9). In particular, cell specificity of POMC promoter activity has been attributed to an interaction between basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors bound to the distal domain, and Pitx homeodomain and Tpit T-box transcription factors bound to the central domain (10, 11, 12). bHLH heterodimers containing NeuroD1/BETA2 bind to the distal Eboxneuro. NeuroD1 is expressed in the developing pituitary primarily in corticotrophs at the time (e12–e15) when POMC begins to be expressed. Its role in the onset of corticotroph differentiation has been recognized in NeuroD1-null mice wherein the emergence of ACTH-positive cells is delayed (13). The dimerization partners of NeuroD1, either the Pan1 (E12), Pan2 (E47), or ITF2 ubiquitous bHLH factors, have been shown to participate in synergistic protein:protein interactions with Pitx factors (11). The pan-pituitary Pitx1 and Pitx2 factors have indeed been assigned a central role in the combinatorial program that coordinates POMC expression, collaborating not only with bHLH factors but also with Tpit (11, 12). Obligate partners of one another, both Tpit and Pitx1 are required for significant transcriptional activation of POMC promoter activity. Unlike Pitx factors, which are important for early pituitary organogenesis (14), Tpit stands out in its contribution to corticotroph cell fate decisions because it is expressed solely in the pituitary POMC-expressing lineages (12) and because it is essential for terminal differentiation of corticotrophs and melanotrophs (15, 16). Tpit is also a negative regulator of the gonadotroph cell fate.

Cellular responses to TGF $\beta$ /BMP/activin signals are mediated for the most part by the Smad family of transcription factors. Specific ligand-induced TGF $\beta$ /BMP serine/threonine receptor complexes, the activin-like kinase (Alk) receptors, recruit and phosphorylate receptor-regulated Smads (R-Smads): Smad-1/5/8 in response to BMP and Smad2/3 in response to TGF $\beta$ /activin stimulation (17, 18, 19). Activated R-Smads subsequently associate with the common-mediator Smad4 (Co-Smad4) and translocate to the nucleus where they enable target gene selection and either positive or negative gene regulation through close interactions with cell type-specific transcriptional partners. The list of Smad DNA-binding partners lengthens with every new target gene characterized; some of the first characterized include the *Xenopus* FAST-1 (Fox H1) protein for the activation of nodal-responsive *Xenopus* Mix.2 (20), the mouse FAST-2 protein mediating activin-induced activation of the gooseoid gene (21) and the Olf-1/EBF-associated zinc finger (OAZ) protein in BMP-mediated positive control of *Xenopus* Xvent-2 activity (22). Whereas OAZ is required to direct the BMP-activated Smad complex to the *Xenopus* Vent-2 promoter (22), Smad1 and Smad4 together are able to confer BMP2 responsiveness to the human *Id* gene promoter independently of other transcription factors (23). TGF $\beta$  induction of transcription has been reported to occur either through recruitment by Smads and/or associated proteins of coactivators like p300, or through a derepression mechanism that involves Smad-directed removal of negative regulators from their binding sites (24).

TGF $\beta$ -induced repression of transcription is less understood. Smad3 was shown to inhibit myogenic processes by directly interfering with the transcriptional activity of MyoD (25). Histone deacetylase-recruiting repressors such as tumor growth inhibitory factor (26), c-ski (27, 28, 29) and SnoN (30, 31, 32) have been implicated in the attenuation of Smad activity. So far, most identified BMP-responsive genes are activated by Smads. However, Smad6 and Smad7 are negative regulators of Smad signaling that interfere with phosphorylation and/or nuclear translocation of R-Smads (33).

We show in the present report that BMP4 signaling negatively regulates endogenous POMC expression as well as POMC promoter activity in AtT-20 cells. The negative regulation of POMC promoter activity by BMP4 is mediated by classical Smad signaling because BMP effects are mimicked and/or increased by the overexpression of specific Alk-3/6 receptors and Smad1 mediator signaling components (34) and counteracted by the overexpression of the specific BMP-inhibitor Smad6, and the general TGF $\beta$  inhibitor Smad7. Our studies moreover identify the Pitx1 and Tpit transcription factors as targets of negative BMP/Smad activity. Direct in vitro bindings of Smad1 with Tpit and/or Pitx1 suggest that protein interactions would be the basis of Smad-directed interferences with Pitx- and Tpit-induced transcription of POMC.

## A1.3 Methods

### Materials

Recombinant (r) human TGF $\beta$ <sub>1</sub>, activin-A, and BMP4 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Anti-Smad1/5/8 (N-18) and anti-phospho-Smad1 (Ser 463 and 465) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), respectively. Anti-Pitx1 and anti-Tpit antibodies were prepared in rabbits as described in Refs.64 and 12 , respectively.

### Plasmids and Oligonucleotides

The different POMC reporter plasmids were constructed in the vector pXP1 luc as described previously (65). Deleted versions of the -480/+63 bp POMC promoter construct were generated as described previously (9). Point mutations and replacement of NurRE, Ebox<sub>neuro</sub>, Pitx, Tpit, and Ebox<sub>ubi</sub> POMC regulatory elements were described in (9). The luc reporter plasmid containing three copies of the 40-bp POMC promoter Pitx and Tpit regulatory element was described (66). For Pitx1 and Tpit expression vectors, Pitx1 and Tpit coding sequences were inserted in a Rous sarcoma virus-driven vector as described in Refs.12 and 67 , and further modified with the *HindIII/KpnI* insertion of a double-stranded oligonucleotide corresponding to the T<sub>3</sub> promoter to allow the *in vitro* synthesis of Pitx1 and Tpit. Reporters 3TP-lux and *Tlx2*-lux and expression vectors for constitutively active BMP type I

receptors and Smad mediators were a gift from J. Wrana and L. Attisano (Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada) and have been described before: Tlx2-lux (39); 3TP-lux (68); pCMV5B/Alk3-HA (Q233D) and Alk6-HA (Q203D) (37, 39); pCMV5B/Flag-Smad1, Flag-Smad2, Flag-Smad3, Smad4-HA, and pGEX<sub>4</sub>T-1/Smad1 (39, 69, 70, 71).

### **Cell Culture and Transfection Assays**

AtT-20 (9) and CV-1 (72) cells were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptavidin antibiotics, and maintained at 37 C and 5% CO<sub>2</sub>. CV-1 cells were transfected by the calcium phosphate coprecipitation method. Cells (40,000) were plated in 12-well-plates. A total of 6 µg of DNA (3 µg of reporter plasmid, 0–1.5 µg of effector plasmid, 50 ng of CMV-β-galactosidase as internal control), was used for each transfection, performed in duplicate. Control experiments contained equivalent amounts of empty expression vector and carrier DNA psp64. Sixteen hours after transfection, medium was changed, and cells were harvested 24 h later. AtT-20 cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described previously (11). Briefly, 250,000 cells/well were plated into 12-well plates; 1.5 µg total DNA was used for each transfection, performed in duplicate (0.5 µg reporter, 0–1 µg effector plasmid, 20 ng of CMV-β-galactosidase as internal control and psp64) together with 5 µl of Lipofectamine in a final volume of 400 µl without serum. After a 20-min incubation at room temperature, the volume was made up to 1 ml with DMEM without serum and left for 4 h on the



cells previously rinsed with DMEM without serum. DMEM (500  $\mu$ l) with 20% FBS was then added to each well, and the cells were recovered 20 h later, using transfection lysis buffer [0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM dithiothreitol (DTT)]. Luc activity was assayed as described previously.  $\beta$ -Gal activity was determined using the  $\beta$ -gal reporter gene Galacto-Star (Applied Biosystems, Foster City, CA) assay system.

### **RNA Isolation and Northern Blot Analysis**

Total cellular RNA was isolated by the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (73). Ten micrograms of RNA were analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel by the RNA-glyoxal method (74). Transfer was performed on a Hybond-N (Amersham) membrane. The RNA was cross-linked on the membrane, which was incubated overnight in a prehybridization solution [80 mM Tris (pH 7.8), 600 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0.1% Na-pyrophosphate, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 100  $\mu$ g/ml of heparin] at 65 C. A 923-bp mouse POMC cDNA fragment was  $^{32}$ P-labeled as described in Ref.72 and used to reveal endogenous mouse POMC mRNA in AtT-20 cells. Hybridization and washes were performed as described in Ref.72 .  $\beta$ -Actin mRNA was revealed on the same Northern blot using a  $^{32}$ P-labeled  $\beta$ -actin cDNA fragment that is described in Ref.75 .

## RT-PCR

AtT-20 cell RNA (2 µg) was used for cDNA synthesis with AMV reverse transcriptase (Promega) according to manufacturer's instructions. RNA extracted from e13.5 embryo forelimbs was similarly processed to obtain cDNA that was used as a positive control for Alk receptor and BMP ligand expression. Each PCR was performed for the detection of BMP2, BMP4, BMP7, or Alk-2 transcripts as described in (12), whereas an annealing temperature of 47 C was used for Alk-6. The primers used are the following:

BMP2	sense,	AGACGTCCTCAGCGAATTTG	BMP2;	antisense,
		GTTTGTGTTTGGCTTGACGC;		
		CGCCGTCATTCCGGATTACAT;	BMP4	sense,
		GGCCCAATCTCCACTCCCTT;	BMP4	antisense,
BMP7	sense,	GACATGGTCATGAGCTTCGT;		
BMP7	antisense,	GTCGAAGTAGAGGACAGAGA;	Alk-2	sense,
		GAGTGATGATTCTTCCTGTGC;	Alk-2	antisense,
		TTGGTGGTGATGAGCCCTTCG;	Alk-6	sense,
		TGGAGCAGTGATGAGTGTCT;	Alk-6	antisense,
		TCTGGGTTCTCTGTGTCTG.		

## Nuclear Extracts and Western Blot Analysis

AtT-20 nuclear extracts were prepared by resuspending the cellular pellet in 400 µl cold buffer A [10 mM KCl, 10 mM Tris (pH 7.9), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM DTT, and protease

inhibitors] and the suspension of cells left to swell on ice for 15 min. NP-40 (0.01%) was added and the suspension was vortexed vigorously for 30 sec. The suspension was gently spun down, the supernatant discarded, and the nuclear pellet resuspended in 50  $\mu$ l of cold Buffer C also containing protease inhibitors [20 mM Tris (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM DTT]. The nuclear suspension was shaken vigorously at 4 C for 1 h, then spun and the supernatant assayed for protein content using the Bradford assay.

Western blot analysis was performed as follows: 25  $\mu$ g of AtT-20 nuclear extracts/sample was resolved on 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to polyvinylidene difluoride membrane and immunoblotted with either 1:2000 dilution of anti-Pitx1 antibody, 1:1000 dilution of anti-Tpit, or 1:1000 dilution of anti-phospho-Smad1 antibody. Immunodetection was possible with the use of horseradish peroxidase-conjugated antirabbit antibody (1:20,000), followed by incubation with ECL Plus detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

### **GST Protein Purification and Pull-Down Assay**

GST and GST-Smad1 proteins were purified from BL21 bacterial cell cultures after GST Gene Fusion System (Amersham Pharmacia Biotech) instructions. The yield of GST proteins was assayed by Bradford and SDS-PAGE analysis. <sup>35</sup>S-Methionine-labeled Pitx1 and Tpit proteins were

synthesized using the TNT-coupled transcription and translation system (Promega) according to the manufacturer's instructions, and assayed by SDS-polyacrylamide gel. Purified GST (500 ng) and GST-Smad1 fusion protein coupled to glutathione Sepharose 4B beads was incubated with 5  $\mu$ l of radiolabeled Pitx1 and/or Tpit proteins in 500  $\mu$ l final volume of a buffer solution made up of 50 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.9), 1 mM EDTA and 0.1 mM of NP-40, at 4 C for 2 h. The Sepharose beads were then washed twice in 125 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.9), 1 mM EDTA, and 0.1 mM of NP-40 buffer; and twice in 200 mM NaCl 50 mM Tris (pH 7.9), 1 mM EDTA and 0.1 mM of NP-40 buffer. Bound protein complexes were eluted before being loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel.

### **Chromatin Immunoprecipitation**

AtT-20 cells treated with 1 nM Bmp-4 were prepared for ChIP as described (76). Sonicated chromatin corresponding to  $10^7$  cells was subjected to immunoprecipitation at 4 C with 5  $\mu$ g of antibodies against Tpit, Pitx1, matched nonimmune IgG (Sigma) as negative control, or with 3  $\mu$ g Phospho-Smad1 (Upstate Biotechnology). Immunoprecipitates were collected with protein A/G agarose beads saturated with tRNA. Beads were washed as described by Upstate Biotechnology. Quantitative real-time PCR (MX-4000; Stratagene, La Jolla, CA) was performed with the SYBR Green kit (QIAGEN, Valencia, CA). Quantitation of  $\beta$ -actin promoter was used as internal control to

normalize POMC promoter enrichment. Fold recruitment was calculated relative to IgG control sample.

## A1.4 Results

### BMP4 Inhibits POMC Expression in AtT-20 Cells

To investigate the role of BMP signaling in regulation of POMC expression, we assessed the effect of BMP4 on POMC mRNA levels in POMC-expressing AtT-20 cells. BMP4 and the related BMP2 are expressed around the developing pituitary; the exact expression patterns, timing and effects of BMP signals on the developing pituitary remain however controversial (2, 3). AtT-20 cells were incubated in presence of recombinant (r)BMP4 for 24 and 48 h and POMC expression was assessed by Northern blot hybridization. As shown in Fig. A1.1A, rBMP4 reduced POMC mRNA levels by about 60% after 48 h. These results are consistent with previous observations that described down-regulation of ACTH expression in e9.5 RP explants cultured in the presence of BMP2-coated beads (3). We have also observed down-regulation of AtT-20 cells POMC mRNA in presence of BMP2 (data not shown) in agreement with the idea that BMP2 and BMP4 have very similar biological activity (25, 33, 34). We cannot exclude that together or in association with other BMPs, such as BMP7, these BMPs may have enhanced activity as shown previously for BMP2/7 and BMP4/7 heterodimers (35, 36).

To determine whether BMP signaling negatively regulates POMC expression at the transcriptional level, a POMC (-480/+63) promoter-luciferase (luc) reporter construct was transiently transfected into AtT-20 cells and the response to rBMP4 was assessed. rBMP4 treatments inhibited POMC

promoter activity in a time-dependent (Fig. A1.1B) and in a concentration-dependent manner (Fig. A1.1C). Repression of POMC-luc activity was significant (50%) after 12 h with 1 nM rBMP4, and an almost maximal after 24 h treatment. When tested at 24 h of treatment, repression was maximal (80%) with 1 nM BMP4.

### **BMP4 Repression Is Mediated through BMP-Specific Receptors and Smad1/4 Transcription Factors**

BMP signals are mediated from the cell membrane to the nucleus through BMP-specific receptors that activate R-Smads (Smad1,5,8). BMP receptor type-I ligand activation can be mimicked by mutations within the GS domain of Alk-3 and Alk-6 (37), so that Alk-3(Q223D) and Alk-6(Q203D) are constitutively activated mutants that signal in the absence of ligand. To test whether BMP repression of POMC activity in AtT-20 cells can be mediated by the activation of BMP-specific receptors, expression vectors encoding Alk-3(Q223D) and Alk-6(Q203D) were used in transfection assays. Overexpressed Alk-3 and Alk-6 decreased POMC-luc activity to levels similar to those produced by rBMP4 (Fig. A1.2A). In subsequent assays, 250 ng of Alk-3(Q223D) was used as an alternative for 1 nM rBMP4 treatments.

If Smad1 participates in BMP-mediated repression of POMC, its overexpression would be expected to increase the sensitivity of AtT-20 cells to BMPs and hence enhance BMP4 inhibitory effects on POMC. When Flag-

Smad1 and/or Smad4-HA were transiently overexpressed in AtT-20 cells, BMP4-mediated repression of POMC-luc activity was significantly enhanced (Fig. A1.2B). The 4-fold inhibition of POMC promoter activity encountered upon overexpression of Smad1/4 in the absence of BMP treatment suggests that BMP signals might already be present in cultured AtT-20 cells to activate Smad proteins. In unstimulated P19 cells, overexpression of Smad1 and Smad4 only slightly repressed POMC promoter activity, and this activity was not additive to the slight inhibitory effect of BMP4 (Fig. A1.2B). Because P19 cells are BMP4 responsive, these data suggest that repression of POMC promoter activity may largely depend on the cellular context of AtT-20 cells.

Smad1 is the best-characterized intracellular transducer of BMP signals. Activation of cytoplasmic Smad1 by BMP receptors is characterized by phosphorylation of the carboxy-terminal serines 462, 463, and 465, and subsequent translocation into the nucleus. To determine whether endogenous Smad1 is indeed activated in AtT-20 cells after rBMP4 treatments, nuclear protein extracts of rBMP4-stimulated and nonstimulated cells were immunoblotted for the presence of phosphorylated Smad1 using an antibody specific for phosphorylated serines 463/465 Smad1. As shown in Fig. A1.2C, small amounts of phosphorylated Smad1 are present in unstimulated AtT-20 cells, consistent with constitutive BMP signaling in these cells. Upon rBMP4 stimulation, nuclear phosphorylated Smad1 was increased, peaking 24 h after rBMP4 addition. When cultured AtT-20 cells were assayed for BMP ligands and/or receptors expression using RT-PCR, they were found to have



transcripts for BMP7, as well as for Alk-2 and Alk-6 BMP-specific type-I receptors (data not shown). Alk-2 and Alk-6 type I receptors have been reported to function in the activation of BMP-specific R-Smads after ligand stimulation (38). Thus, it appears that AtT-20 cells express BMP receptors and at least one ligand, BMP7, and these may account for constitutive BMP signaling in agreement with the low levels of phospho-Smad1 in unstimulated conditions.

### **BMP/Smad1 Signaling Specifically Represses POMC Promoter Activity**

BMP/Smad1 signaling is known to activate transcription from the mouse *Tlx-2* promoter in P19 cells (39). We first asked whether the same BMP-signaling pathway may repress POMC and activate *Tlx2* promoter activity. In AtT-20 cells, we show that, whereas Alk-3 and Smad1/4 overexpression represses POMC-luc activity by at least 2-fold, it does not repress *Tlx2*-luc activity but induces it very weakly (Fig. A1.3A). POMC-luc and *Tlx2*-luc promoter activities responded in the same direction in P19 cells, but *Tlx2*-luc was much more responsive (Fig. A1.3B). These data indicate that the inhibitory effects of the BMP pathway on the POMC promoter are promoter specific and do not reflect a general cellular response.

Different members of the TGF $\beta$  superfamily of growth factors were tested for the specificity of their effects on POMC promoter activity in both AtT-20 and P19 cells. The *Tlx2*-luc and 3TP-luc reporters were used, as controls of

BMP- and TGF $\beta$ -dependent signals, respectively (39, 40). The stimulation of 3TP-lux activity by rActivin or rTGF $\beta$ , showed that AtT-20 cells are responsive to different members of the TGF $\beta$  family of growth factors (Fig. A1.3C). POMC promoter activity was repressed in AtT-20 and P19 cells treated with rBMP4 (1 nM) or rActivin-A (500 pM) but was not affected in either cell type challenged with TGF $\beta$  (100 pM) (Fig. A1.3, C and D). The activin-mediated repression of POMC promoter activity observed in AtT-20 cells is in support of previous work showing reduced accumulation of secreted ACTH upon activin-A treatment (41). Also highlighting their difference in signaling, rActivin, but not rBMP4 treatment, repressed Tlx2 promoter activity in AtT-20 cells (Fig. A1.3C).

Although the intracellular activity of Smad1 is specific to BMP responses, Smad2 and Smad3 activities have been assigned to activin and TGF $\beta$  signaling pathways (42). To assess the specific TGF- $\beta$  signaling pathway involved in repression of POMC promoter in AtT-20 cells, increasing concentrations of Flag-Smad1, Flag-Smad2, or Flag-Smad3 were overexpressed in these cells and the activity of POMC-luc assayed. Only Smad1 repressed the POMC promoter (Fig. A1.3E), suggesting that an endogenous autocrine BMP signaling pathway is acting to repress POMC in AtT-20 cells.

### **Smad6 and Smad7 Counteract BMP-Mediated Repression of POMC**

Smad6 and Smad7 are known inhibitors of BMP/TGF $\beta$ -induced cellular responses. The down-regulation of POMC promoter activity after BMP4 treatment or Smad1/4 overexpression was completely blocked by overexpression of the BMP-specific inhibitor Smad6 (Fig. A1.4A) and the general TGF $\beta$  inhibitor Smad7 (Fig. A1.4B). Notably, basal POMC promoter activity was augmented by overexpression of Smad6 and Smad7, indicating once more that autocrine BMP signaling may be repressing constitutive POMC expression in these cells.

### **Negative BMP/Smad Signals Target Pitx/Tpit Activities on the POMC Promoter**

The POMC promoter has been divided into three regions; namely, distal (-480/(-324 bp), central (-323/(-166 bp), and proximal (-165/-34 bp) regions (9). In an attempt to identify POMC promoter sequences that are responsive to BMP/Smad signaling, we tested the BMP4 response of constructs containing these promoter regions, alone or in combination. Previous studies had shown that central and distal domains act in synergy and that this synergism is cell specific (9, 43). Only the reporter construct containing both distal and central POMC promoter regions responded to rBMP4 stimulations to the same extent as did the full-length promoter (Fig. A1.5A). These results suggest that BMP

signaling negatively targets synergistic activities acting on the distal and central domains of the POMC promoter.

The distal and central domains of the POMC promoter contain most of the critical regulatory elements for cell-specific recognition, for synergism between the two domains, as well as for hormone response (10, 12, 44). We used element-specific mutants to determine which is/are required for BMP inhibitory signaling. Mutagenesis of either Nur factor response element (NurRE) that confers CRH and glucocorticoid responsiveness (44) or of the  $Ebox_{neuro}$  that confers cell-specific recognition by neurogenic bHLH factors and synergism with the central promoter domain (11) did not affect BMP4 responsiveness (Fig. A1.5B). However, BMP4 sensitivity was lost upon mutagenesis of either Pitx1 or Tpit binding sites.

Tpit is a T-box transcription factor (12) that binds DNA cooperatively and that synergizes transcriptionally with Pitx1; their binding sites are only 5 bp away from each other. The restricted action of BMP4 on Tpit/Pitx1 indicates that it is primarily their activity rather than their synergism with NeuroD1 dimers acting as  $Ebox_{neuro}$  that is targeted by Smad action. To verify this, a reporter construct driven by three oligomers containing the Pitx/Tpit response element (12) was transfected in CV-1 cells and found to be repressed by Alk-3 (Q223D) (Fig. A1.6). Repression was most evident in the presence of both Pitx1 and Tpit, but a similar tendency was also observed on Tpit-dependent activity. Because BMP4-expressing epithelia have been documented to repress Pitx1 expression in mandibular mesenchyme (45), we analyzed

whether activation of the BMP4 signaling pathway in AtT-20 cells affected the expression of Pitx1 and/or Tpit. Nuclear protein extracts from AtT-20 cells treated or not with rBMP4 were assayed by Western blot for Pitx1 and Tpit protein levels. No change in Pitx1 or Tpit protein expression was detected (Fig. A1.2C), in agreement with the interpretation that BMP signaling interferes with Pitx/Tpit activity (Fig. A1.6).

### **Smad1, Pitx1, and Tpit Proteins Interact *in Vitro***

One manner in which BMP-activated Smad1 (Fig. A1.2C) could interfere with the transcriptional activities of Pitx and Tpit would be through protein:protein interactions. Indeed, the mutagenesis results that showed dependence on the Pitx and Tpit binding sites (Fig. A1.5B) and that also showed great sensitivity of the synergistic activity between distal and central promoter elements (Fig. A1.5A) could be explained by recruitment of activated Smad proteins to promoter-bound Pitx1 and/or Tpit. Such interactions may lead to promoter dissociation of the factors or alternatively, may prevent the actions of Pitx1/Tpit (including both *trans*-activation and synergism with bHLH dimers) through protein interference. As a first step toward testing this hypothesis, we used a glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay to show interactions of *in vitro*-translated Pitx1 and Tpit with Smad1 but not with GST or GST-luc (Fig. A1.7A). To test whether BMP signaling does result in Smad1 recruitment to the POMC promoter and whether this recruitment may affect promoter occupancy by Pitx and/or Tpit, we used the chromatin

immunoprecipitation (ChIP) technique to assess POMC promoter occupation before and after treatment with BMP4 (Fig. A1.7B). These experiments indicated that POMC promoter occupancy by both Pitx1 and Tpit is unchanged after BMP4 treatment. On the other hand, BMP4 treatment leads to promoter recruitment of phospho-Smad1 in agreement with activation of this regulatory Smad after BMP4 treatment (Fig. A1.2C). Taken together, these data are consistent with a model in which activated phospho-Smad1 is recruited to the POMC promoter through protein-protein interactions with Pitx1 and/or Tpit and in which the resulting complex hampers the transcriptional activity of Pitx1 and Tpit.

## **A1.5 Discussion**

Transcription factors Pitx1 and Tpit are critical for terminal differentiation and identity of corticotroph cells. These factors participate in synergistic interactions that are the basis of cell-specific POMC transcription. We have shown that BMP4 and Smad1-specific signaling pathways repress POMC expression in AtT-20 cells, and we propose that interactions of Smad1 with Pitx and Tpit constitute the basis of this repression.

### **Mechanisms of BMP Repression of POMC Transcription**

Few examples of TGF $\beta$ /BMP/Smad repression of transcription have been reported (46, 47). We show that BMP4 signaling represses endogenous POMC expression in AtT-20 cells (Fig. A1.1A) as well as POMC promoter activity (Fig. A1.1, B and C). We further show that the classical cognate receptor/Smad signaling pathway conveys BMP signals to the nucleus in AtT-20 cells. Indeed, BMP4 inhibitory effects on POMC promoter activity were mimicked by expression of the BMP-specific intracellular mediator Smad1 (Fig. A1.2B) but not by Smad 2 or 3 (Fig. A1.3E) and constitutively activated forms of either Alk-3 or Alk-6 receptors (Fig. A1.2A). Recently, other signaling pathways such as the cascades that implicate ERK, protein kinase C, cAMP-dependent protein kinase A, and TGF-activated kinase-1 activities have been implicated in BMP responses (48, 49, 50, 51). In light of this, the possibility that Smad-independent pathways are involved in BMP-induced effects on

POMC expression is not excluded. However, Smad6 and Smad7 overexpression studies (Fig. A1.4) suggest that BMP-induced inhibitory POMC responses are principally mediated by the Smad signaling pathway.

Smad translocation into the nucleus is known to require ligand stimulation, suggesting that the mere presence of supplementary Smad mediator proteins would not suffice to affect gene responses in cells. However, some groups have demonstrated that transiently overexpressed Smad proteins are able to transactivate target genes in a ligand-independent manner (52, 53). We found that overexpression of Smad1 alone or in combination with Smad4 could repress POMC expression up to 4-fold in AtT-20 cells (Fig. A1.2B) even in the absence of exogenous BMP stimulation. Overexpressed Smad1 could be acting in a ligand-independent manner if supplementary amounts of Smad1 were to overcome some mechanism of negative signaling present in AtT-20 cells, such as that produced by inhibitory Smad6 or Smad7 or simply by microtubule sequestration of Smads (33). Still, evidence that BMP7 signaling may operate in an autocrine way in AtT-20 cells is in favor of a ligand-dependent activity of overexpressed Smad1 in these cells. Our findings that overexpression of Smad6 or Smad7 could reverse POMC repression by BMP signals, whether they are endogenous or exogenous, furthermore suggests that these or other BMP antagonists might be working against BMP/Smad-mediated repression of POMC in some circumstances during development.



## Specificity of BMP Repression of POMC

It appears that different members of the TGF $\beta$  superfamily of signaling molecules repress POMC expression. We observed that rActivin-A, but not rTGF $\beta$ , repressed POMC to a similar extent as did rBMP4 (Fig. A1.4C). Others had implicated Activin-A in inhibition of POMC mRNA accumulation and ACTH secretion from AtT-20 cells (41) and shown negative regulation of POMC mRNA by TGF $\beta$  in hypothalamic neurons (54). Our failure to observe TGF $\beta$  down-regulation of POMC expression in AtT-20 cells may be due to the use of the POMC (-480/+63) promoter region in our work: this promoter fragment does not contain regulatory sequences for hypothalamic expression of POMC (55). Although we did detect in AtT-20 cells transcripts coding for the Alk-2 type I TGF $\beta$  receptor, which is known to mediate common responses to activin and BMP7 (38), we could not detect activation of Smad1 in rActivin-treated AtT-20 cells. We were moreover unable to detect any effects on POMC promoter activity after the overexpression of activin-specific Smad2 and Smad3 at concentrations for which Smad1-inhibited POMC expression (Fig. A1.3E). These data may suggest a Smad-independent effect of activin on POMC expression in AtT-20 cells, although they may also reflect an absence of autocrine activin signaling in AtT-20 cells. In muscle cells for example, TGF $\beta$ -mediated repression of IGF binding protein-5 has been described to occur through c-Jun N-terminal kinase signaling pathways (56).

Smad1 and Alk-3/-6 signaling components were shown to repress POMC transcription and to induce transcription from the Tlx2 promoter in the

same cells (Fig. A1.3, A and B), as described previously in P19 cells (39). Smad interactions with POMC and Tlx2 promoter-specific transcription factors are likely responsible for these opposite BMP responses. Indeed, Smad binding to DNA is not selective (57), and gene recognition by the Smad complex is thought to occur by way of interactions with specific transcription cofactors. Smad1-mediated induction of Xvent-2 expression for example requires cooperation with the OAZ transcription factor (22). Differential Smad interactions with POMC and Tlx2 promoter-specific transcription factors are the likely explanation for the difference in BMP responses: a Smad DNA-binding partner responsible for activation of Tlx2 has not yet been identified. Our studies support an essential role for interdependent Pitx and Tpit transcription factors in the mechanisms of Smad-mediated repression of POMC (Fig. A1.5). Not only are Pitx and Tpit regulatory elements important for activation of POMC transcription (12), but we show that absence of either activity prevents repression by the BMP pathway (Fig. A1.6). These observations together with demonstration of *in vitro* interactions of Smad1 with Pitx1 and Tpit suggest that Pitx and Tpit transcription factors are the principal targets of negative Smad action on the POMC promoter. Smad2 was previously shown to interact with paired-like homeodomain proteins of the Mix family, Mixer and Milk, through a Smad-interacting motif that is also found in members of the FAST family of winged-helix transcription factors (58). However, we could not locate a similar domain in bicoid-related Pitx

homeodomain proteins. There are no precedents for interactions between members of the T-box and Smad families.

Promoter mutations (Fig. A1.5B) and simple reporter experiments (Fig. A1.6) clearly indicate that the primary target of BMP/Smad repression is the Pitx/Tpit pair of transcription factors. Because this repression could be reconstituted in heterologous cells (CV1) using a simple multimeric reporter gene (Fig. A1.6), the simplest model that can be proposed to explain transcriptional repression by Smad1 would have to rely on protein interactions between Smad1 and Tpit and/or Pitx1 (Fig. A1.7A). Direct protein interactions between these different transcription factors may repress transcription in different ways. For example, after BMP binding to Alk receptors, and the resulting phosphorylation and nuclear translocation of Smad1 (Fig. A1.2C), Smad1 could form a complex with Pitx1 and Tpit that no longer has the ability to bind DNA, thus resulting in repression of POMC transcription. Such model does not appear to take place because POMC promoter occupancy of Pitx1 and Tpit is not altered after BMP4 stimulation and recruitment of Smad1 to the same promoter (Fig. A1.7B). On the other hand, these CHIP data would be entirely consistent with a model in which promoter-bound Pitx1 and Tpit interact and recruit phospho-Smad1 (Fig. A1.8). This recruitment may prevent the interaction of Pitx1 and Tpit with coactivators such as steroid receptor coactivator 2 (59) and may further hamper synergistic interactions with bHLH dimers (11) in agreement with the data of Fig. A1.5B showing the sensitivity of the distal/central synergistic activity of the POMC promoter to BMP repression.

Promoter-recruited Smad1 could also remodel the chromatin template into a closed conformation through the recruitment of histone deacetylases. Smad2 has been shown to act as a repressor of transcription by associating with tumor growth inhibitory factor in the repression of the Cdc25A promoter for example (60).

### **Possible Role of BMPs in Pituitary**

Repression of gene activity plays an important role in the restriction of many regulatory genes during embryonic development. For example, repressor bHLH factors of the Hairy and enhancer of split homolog family play essential developmental roles by delaying the differentiation of neurons in the developing brain such that they undergo terminal differentiation only once they have completed migration to final destination (61). Also, TGF $\beta$  was implicated in the inhibition of myogenic differentiation through Smad3-mediated repression of MyoD transcriptional activity (62). In a similar fashion, BMP/Smad repression of Pitx1 and/or Tpit, and of POMC transcription could serve to delay terminal differentiation of corticotrophs until the appropriate time during pituitary organogenesis. In this respect, it is interesting to note that BMP signals are particularly strong around developing pituitary before the onset of cell differentiation around e12.5. Many molecules implicated in BMP signaling could modulate the simple pathway illustrated in Fig. A1.8. Indeed, regulation of the repressor Smads, Smad6 and Smad7, could play significant roles in the ultimate activity of this pathway. In addition, secreted molecules such as

Noggin and Chordin can interfere and modulate the action of BMPs on their receptors (63). Manipulation of some of these constitutive constituents has already been shown to have dramatic effects on pituitary development and cell differentiation (2).

It is also possible that BMP signals may serve functions in the adult pituitary. Although the AtT-20 cells are of tumor origin and may not be entirely representative of normal corticotrophs, their apparent autocrine regulation by BMP signaling (Fig. A1.4) may be an indication of similar regulation in fully differentiated corticotrophs. Alternatively, BMP signals may also serve a paracrine function to maintain balance between the various lineages in the adult pituitary.

## A1.6. References

1. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, Pfaff SL, Westphal H, Kimura S, Mahon KA 1998 Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development* 125:4835–4840
2. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, Rosenfeld MG 1998 Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev* 12:1691–1704
3. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T 1998 Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development* 125:1005–1015
4. Japon MA, Rubinstein M, Low MJ 1994 In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. *J Histochem Cytochem* 42:1117–1125
5. Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman, AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG 1999 Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* 97:587–598

6. Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chrétien M, Seidah NG 1991 PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3564–3568
7. Tremblay Y, Tretjakoff I, Peterson A, Antakly T, Zhang CX, Drouin J 1988 Pituitary-specific expression and glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8890–8894
8. Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ 1992 Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary gland of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 12:3978–3990
9. Therrien M, Drouin J 1991 Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492–3503
10. Poulin G, Turgeon B, Drouin J 1997 NeuroD1/BETA2 contributes to cell-specific transcription of the POMC gene. *Mol Cell Biol* 17:6673–6682
11. Poulin G, Lebel M, Chamberland M, Paradis FW, 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

12. Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J 2001 A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104:849–859
13. Lamolet B, Poulin G, Chu K, Guillemot F, Tsai MJ, Drouin J 2004 Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocrinol* 18:995–1003
14. Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA 2002 Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129:329–337
15. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Tsai JPY, Couture C, Gauthier Y, Drouin J 2003 Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev* 17:738–747
16. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J 2003 Human and mouse Tpit gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 17:711–716
17. Gagner J-P, Drouin J 1985 Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol Cell Endocrinol* 40:25–32



18. Gagner J-P, Drouin J 1987 Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 1:677–682
19. Drouin J, Trifiro MA, Plante RK, Nemer M, Eriksson P, Wrange Ö 1989 Glucocorticoid receptor binding to a specific DNA sequence is required for hormone-dependent repression of pro-opiomelanocortin gene transcription. *Mol Cell Biol* 9:5305–5314
20. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M 1997 Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389:85–89 [[CrossRef](#)][[Medline](#)]
21. Labbe E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, Attisano L 1998 Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF  $\beta$ -dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 2:109–120
22. Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J 2000 OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100:229–240
23. Korchynskiy O, ten Dijke P 2002 Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic

- protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277:4883–4891
24. Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X 1999 Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 274:13711–13717
25. Derynck R, Zhang Y, Feng XH 1998 Smads: transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses. *Cell* 95:737–740
26. Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J 1999 A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97:29–39
27. Wang W, Mariani FV, Harland RM, Luo K 2000 Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14394–14399
28. Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, Kusanagi K, Nemoto N, Miyazono K, Kawabata M 1999 c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- $\beta$  signaling through interaction with smads. *J Biol Chem* 274:35269–35277
29. Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA 1999 Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF- $\beta$  signaling. *Mol Cell* 4:499–509

30. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K 1999 Negative feedback regulation of TGF- $\beta$  signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286:771–774
31. Sun Y, Liu X, Ng-Eaton E, Lodish HF, Weinberg RA 1999 SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12442–12447
32. He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS, Luo K 2003 The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *J Biol Chem* 278:30540–30547.
33. Wrana JL 2000 Regulation of Smad activity. *Cell* 100:189–192
34. Hogan BL 1996 Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580–1594
35. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM 1996 Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13:291–300
36. Nishimatsu S, Thomsen GH 1998 Ventral mesoderm induction and patterning by bone morphogenetic protein heterodimers in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* 74:75–88
37. Akiyama H, Shigeno C, Hiraki Y, Shukunami C, Kohno H, Akagi M, Konishi J, Nakamura T 1997 Cloning of a mouse smoothed cDNA and expression patterns of hedgehog signalling molecules during

- chondrogenesis and cartilage differentiation in clonal mouse EC cells, ATDC5. *Biochem Biophys Res Commun* 235:142–147
38. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K 1994 Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269:16985–16988
39. Tang SJ, Hoodless PA, Lu Z, Breitman ML, McInnes RR, Wrana JL, Buchwald M 1998 The *Tlx-2* homeobox gene is a downstream target of BMP signalling and is required for mouse mesoderm development. *Development* 125:1877–1887
40. Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF 1997 Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor  $\beta$ -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17:7019–7028
41. Bilezikjian LM, Blount AL, Campen CA, Gonzalez-Manchon C, Vale W 1991 Activin-A inhibits proopiomelanocortin messenger RNA accumulation and adrenocorticotropin secretion of AtT20 cells. *Mol Endocrinol* 5:1389–1395
42. Massague J 1998 TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753–791

43. Therrien M, Drouin J 1993 Cell-specific helix-loop-helix factor required for pituitary expression of the pro-opiomelanocortin gene. *Mol Cell Biol* 13:2342–2353
44. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanisms in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946–5951
45. St Amand TR, Zhang YD, Semina EV, Zhao X, Hu YP, Nguyen L, Murray JC, Chen YP 2000 Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol* 217:323–332
46. Kang Y, Chen CR, Massague J 2003 A self-enabling TGF $\beta$  response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11:915–926
47. Kowanetz M, Valcourt U, Bergstrom R, Heldin CH, Moustakas A 2004 Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor  $\beta$  and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* 24:4241–4254
48. Lai CF, Cheng SL 2002 Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$  in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 227:15514–15522

49. Hay E, Lemonnier J, Fromigue O, Marie PJ 2001 Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 276:29028–29036
50. Kretzschmar M, Doody J, Massague J 1997 Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1. *Nature* 389:618–622
51. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K 1995 Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- $\beta$  signal transduction. *Science* 270:2008–2011
52. Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R 1996 Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- $\beta$  response. *Nature* 383:168–172
53. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P 1997 TGF- $\beta$  receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16:5353–5362
54. Bouret S, Chuoi-Mariot MT, Prevot V, Croix D, Takumi T, Jegou S, Vaudry H, Beauvillain JC, Mitchell V 2001 Evidence that TGF  $\beta$  may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus. *Endocrinology* 142:4055–4065

55. Young JI, Otero V, Cerdan MG, Falzone TL, Chan EC, Low MJ, Rubinstein M 1998 Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *J Neurosci* 18:6631–6640
56. Rouse S, Lallemand F, Montarras D, Pinset C, Mazars A, Prunier C, Atfi A, Dubois C 2001 Transforming growth factor- $\beta$  inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-5 synthesis in skeletal muscle cells involves a c-Jun N-terminal kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 276:46961–46967
57. Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP 1998 Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- $\beta$  signaling. *Cell* 94:585–594
58. Germain S, Howell M, Esslemont GM, Hill CS 2000 Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* 14:435–451
59. Maira MH, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J 2003 The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 coactivators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 278:46523–46532

60. Iavarone A, Massague J 1997 Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF- $\beta$  in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 387:417–422
61. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F 1995 Targeted disruption of mammalian hairy and enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9:3136–3148
62. Liu D, Black BL, Derynck R 2001 TGF- $\beta$  inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15:2950–2966
63. Balemans W, Van Hul W 2002 Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 250:231–250
64. Lanctôt C, Gauthier Y, Drouin J 1999 Pituitary homeobox 1 (Ptx1) is differentially expressed during pituitary development. *Endocrinology* 140:1416–1422
65. Nordeen SK 1988 Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6:454–456
66. Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctôt C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J 1996 PTX1, a *bicoid*-related homeobox transcription factor involved in



- transcription of pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Genes Dev* 10:1284–1295
67. Tremblay JJ, Marcil A, Gauthier Y, 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
68. Willis SA, Zimmerman CM, Li LI, Mathews LS 1996 Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10:367–379
69. Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massague J 1996 Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16:1066–1073
70. Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL 1996 MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87:1215–1224
71. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL 1996 MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489–500
72. Jeannotte L, Trifiro MA, Plante RK, Chamberland M, Drouin J 1987 Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin gene promoter. *Mol Cell Biol* 7:4058–4064

73. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
74. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J 1982 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
75. Grépin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M 1995 Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15:4095–4102
76. Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, Hinds PW 2001 The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell* 8:303–316

## **A1.7 Acknowledgements**

We are deeply indebted to Jeffrey Wrana and Liliana Attisano for their gift of the plasmids encoding regulatory proteins of the BMP/Smad signaling pathways. We thank Eric Batsché for help in setting up the CHIP assays and Lise Laroche for her expert secretarial assistance.

## **A1.8 Footnotes**

This work was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada with funds provided by the Canadian Cancer Society.

First Published Online February 3, 2005

Abbreviations: Alk, Activin-like kinase; bHLH, basic helix-loop-helix; BMP, bone morphogenic protein; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DTT, dithiothreitol; e, embryonic day; GST, glutathione-S-transferase; luc, luciferase; NP-40, Nonidet P-40; NurRE, Nur factor response element; POMC, proopiomelanocortin; rBMP4, recombinant BMP4; OAZ, Olf-1/EBF-associated zinc finger; RP, Rathke's pouch; SDS, sodium dodecyl sulfate.

Received for publication October 19, 2004. Accepted for publication January 24, 2005.

## A1.9 Figure Legends

### Fig. A1.1. BMP4 Represses POMC Expression and Promoter Activity

A, Northern blot analysis of POMC mRNA in AtT-20 cells treated with 1 nM BMP4 for 24 and 48 h, compared with nontreated cells. Bands corresponding to POMC mRNA were quantified by densitometry and compared with  $\beta$ -actin mRNA used as internal control. B and C, Effect of rBMP4 on AtT-20 cells transfected with a luc reporter gene driven by the POMC promoter (-480/+63). B, rBMP4 (1 nM) represses POMC-luc activity in a time-dependent manner. C, Dose response of POMC promoter repression by rBMP4 measured after 24 h treatment. Results in panels B and C were standardized relative to CMV- $\beta$  gal reporter activity used as internal control. *Asterisk*, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's *t* test.

### Fig. A1.2. BMP4 Repression Is Mediated through BMP-Specific Receptors and Smad1/4 Transcription Factors

A, Overexpression of increasing amounts of constitutively active Alk-3 (Q223D) and Alk-6 (Q203D) receptors down-regulates POMC-luc reporter activity in AtT-20 cells to similar or greater levels than those observed in cells stimulated with rBMP4. pcDNA 1 was used as control vector. B, Flag-Smad1 (S1) overexpressed alone, or together with Smad4-HA (S4), represses POMC-luc activity when transfected in AtT-20 and P19 cells, and furthermore enhances BMP inhibitory effects in AtT-20 cells. Results are the average

( $\pm$ SEM) from at least three sets of experiments performed in duplicate. In each cell line, the basal activity of POMC-luc was similar (about 50,000 relative light units/mg protein). Asterisk, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's t test. C, After 4, 24, and 48 h of 1 nM BMP4 treatment of AtT-20 cells, nuclear extracts (25  $\mu$ g) were assayed for content of phosphorylated Smad1 protein using an antibody against Smad1 phosphorylated on Serine 463 and 465 of the C-term SSXS motif. The 65-kb band corresponds to phosphorylated Smad1 (arrow), whereas the slower migrating band may be another BMP-specific Smad, such as Smad5 or Smad8. The same blots were assayed by Western blotting for levels of Tpit and Pitx1.

**Fig. A1.3. BMP/Smad1 Signaling Specifically Represses POMC**

In both AtT-20 and P19 cells, overexpression of Alk-3 and Smad1 (A and B) as well as rBMP4 treatments (C and D) repress POMC-luc but not Tlx2-luc or 3TP-luc reporter activities. Noteworthy is the greater sensitivity of POMC promoter activity to BMP/Smad-mediated repression in AtT-20 cells compared with P19 cells. POMC-luc activity is also repressed by rActivin-A, but not rTGF $\beta$  treatments (C and D). Tlx2-luc activity is induced by Smad1/4, Alk-3, and BMP4 in P19 cells (B and D), but only by Smad1/4 and Alk-3 overexpression in AtT-20 cells (A). The TGF $\beta$ -specific 3TP-luc reporter is activated in both P19 and AtT-20 cells by rActivin and rTGF $\beta$  but not by rBMP4. E, Increasing concentrations of Flag-Smad1, but not Flag-Smad2 or

Flag-Smad3 repress the activity of POMC-luc transfected in AtT-20 cells. Results are the average ( $\pm$ SEM) from at least three sets of experiments in duplicate. *Asterisk*, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's *t* test.

**Fig. A1.4. Inhibitory Smad6 and Smad7 Reverse BMP/Smad-Dependent POMC Repression**

Increasing concentrations of the BMP-specific inhibitor Smad6 (A) and the general TGF $\beta$  inhibitor Smad7 (B) counteract the repressive effects of Smad1/4 overexpression and rBMP4 treatment on POMC-luc activity in AtT-20 cells. Results are the average ( $\pm$ SEM) from at least three sets of experiments in duplicate. *Asterisk*, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's *t* test.

**Fig. A1.5. BMP Signals Target Pitx1 and Tpit Regulatory Elements on POMC**

A, Activities of distal, central, and proximal regions of the  $-480/-34$  POMC promoter, alone or in combination, inserted upstream of the minimal ( $-34/+63$ ) POMC promoter were tested in BMP4-treated AtT-20 cells and are shown relative to their respective basal activities in nontreated cells. Only the combined activity of distal and central promoter regions (D + C), in a similar fashion to the ( $-480/+63$ ) full-length promoter (D + C + P), is repressed by BMP signaling. B, Relative activities (in BMP4-treated vs. nontreated AtT-20 cells) of point and replacement mutants of either NurRE, Ebox<sub>neuro</sub>, Tpit, Pitx1,

or Ebox<sub>ubi</sub> regulatory elements within the distal and central domains of the (–480/+63) rPOMC promoter. The loss of Tpit or Pitx regulatory elements abolishes BMP4 inhibitory effects. All promoter mutants maintain at least 10 times more promoter activity than the minimal promoter (Min) construct. *Asterisk*, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's *t* test.

**Fig. A1.6. The Tpit/Pitx Regulatory Element Is Sufficient for BMP Repression without Changes in Tpit or Pitx Levels**

Overexpression of constitutively active Alk-3 (Q223D) receptor in POMC nonexpressing CV-1 cells abolishes reconstituted Tpit activity, as well as transcriptional synergy between Pitx1 and Tpit on a luc reporter driven by a trimerized 40-bp POMC oligonucleotide that contains both Pitx and Tpit binding sites. Results are the average ( $\pm$ SEM) from at least three sets of experiments in duplicate. *Asterisk*, Statistical difference ( $P < 0.05$ ) compared with control sample using the Student's *t* test.

**Fig. A1.7. Smad1 Interacts with Pitx1 and Tpit and Is Recruited to the POMC Promoter**

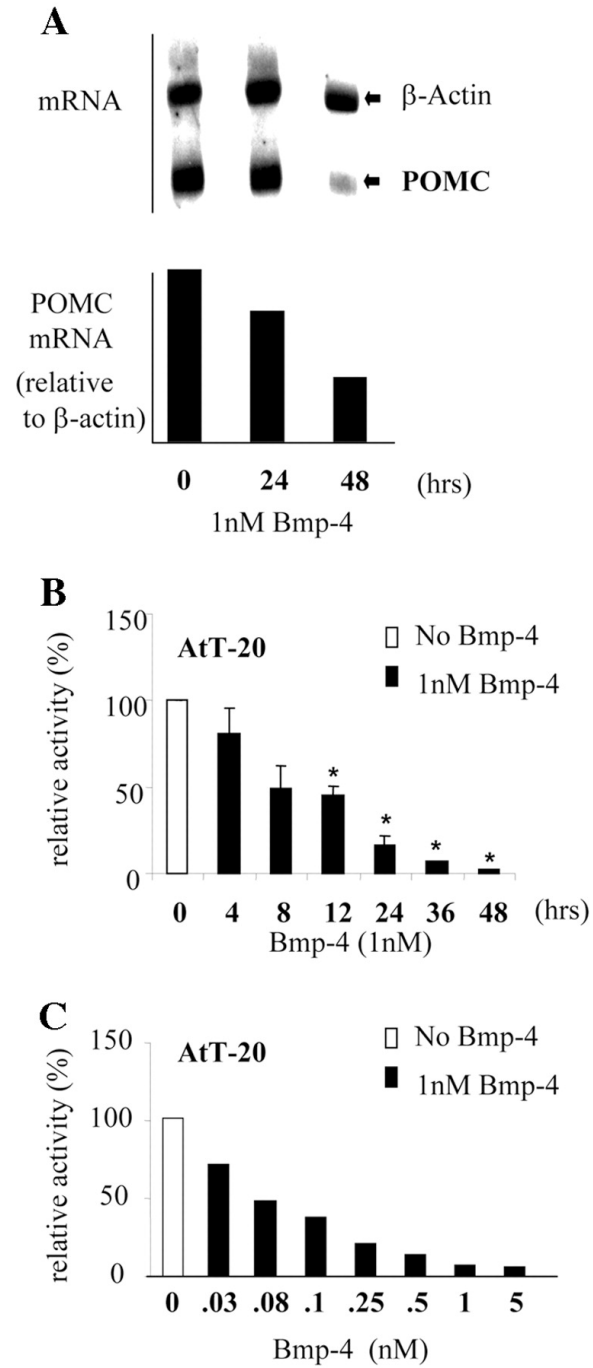
A, In pull-down assays, GST resin-bound Smad1 (GST-S1) but not resin-bound control (GST) pulled down <sup>35</sup>S-labeled Pitx1 and Tpit proteins synthesized separately or cosynthesized *in vitro*. *In vitro*-translated <sup>35</sup>S-labeled luc did not bind to either GST or GST-S1. B, ChIP analysis of POMC promoter recruitment of Pitx1, Tpit, and phospho-Smad1 with and without BMP4



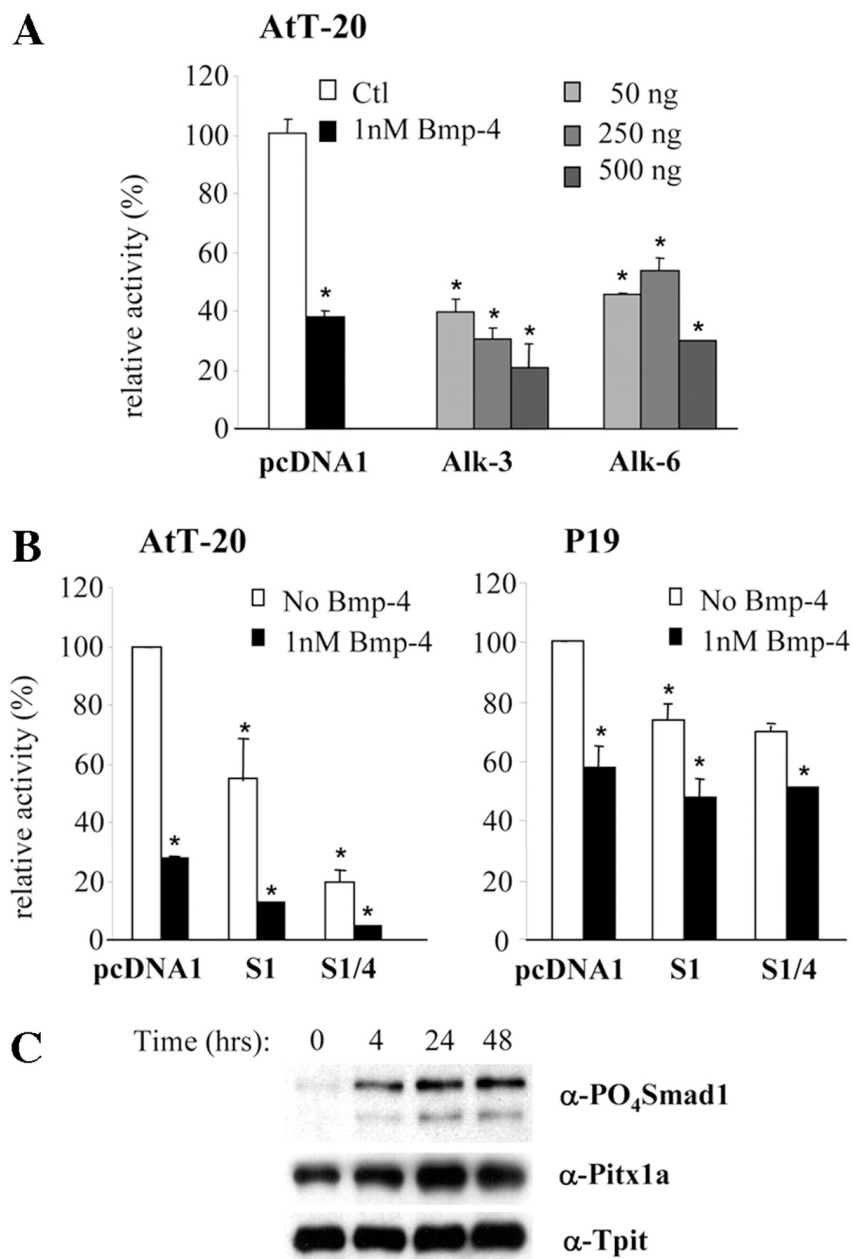
treatment. Promoter recruitment for each protein is expressed relative to an IgG control.  $\beta$ -Actin was used as an internal standard to normalize POMC promoter recruitment.

**Fig. A1.8. Model for BMP-Induced Transcriptional Repression of POMC**

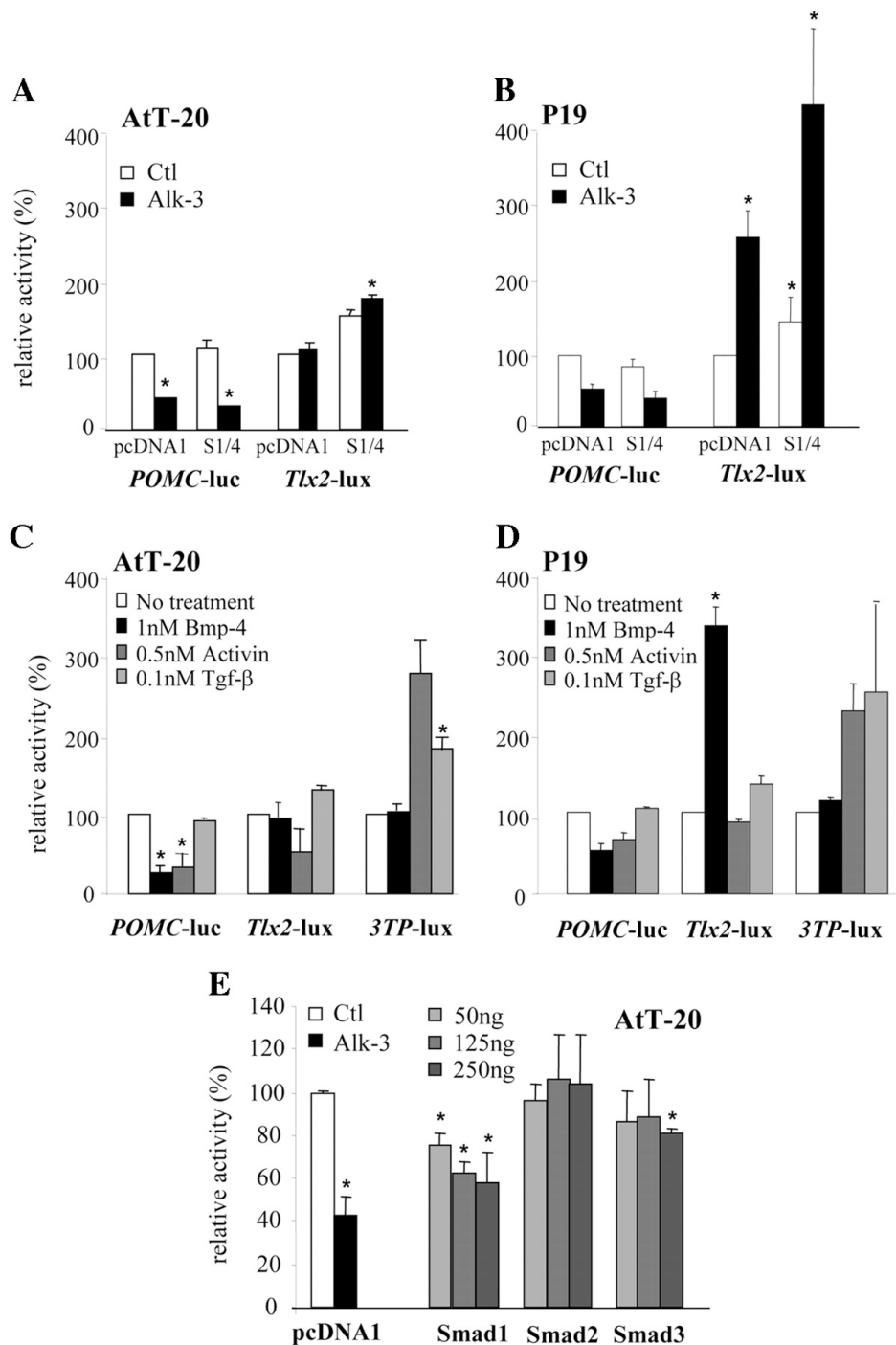
A Smad1/4 complex translocates to the nucleus upon BMP stimulation, is recruited to the POMC promoter by interactions with Pitx and Tpit and subsequently disrupts transcriptional activity.



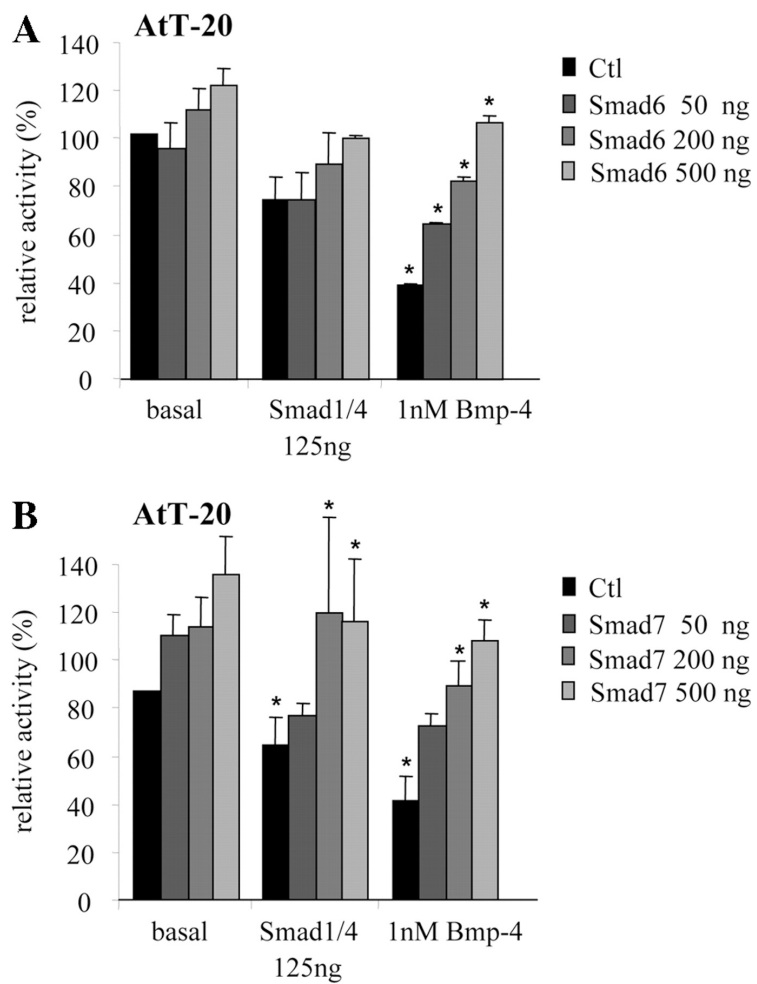
**Fig. A1.1 BMP4 Represses POMC Expression and Promoter Activity**



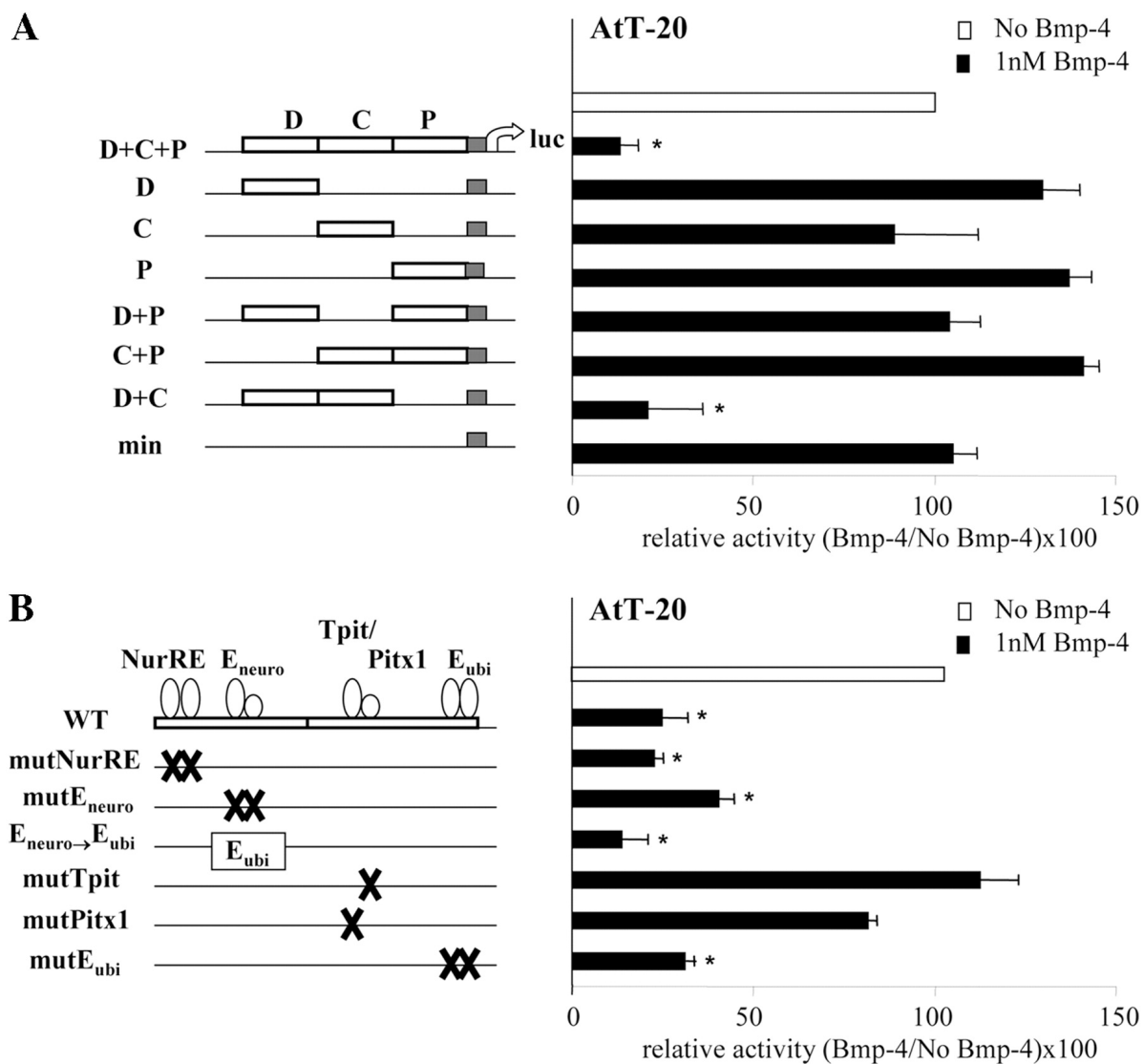
**Fig. A1.2 BMP4 Repression Is Mediated through BMP-Specific Receptors and Smad1/4 Transcription Factors**



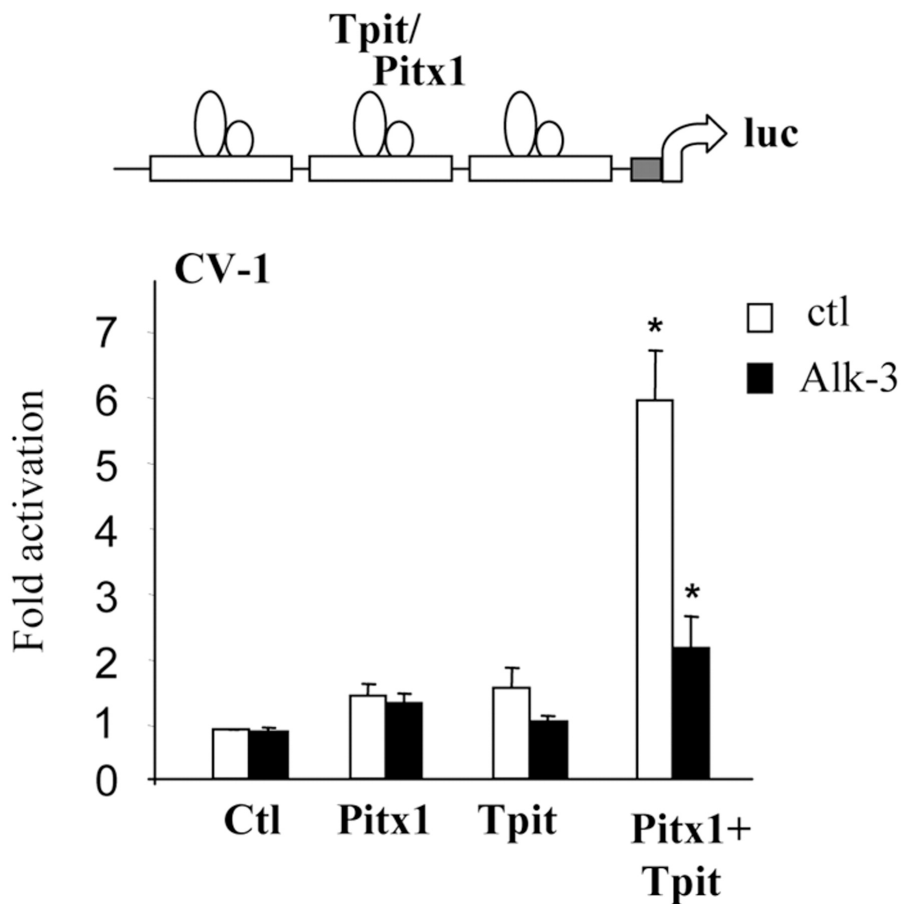
**Fig. A1.3 BMP/Smad1 Signaling Specifically Represses POMC**



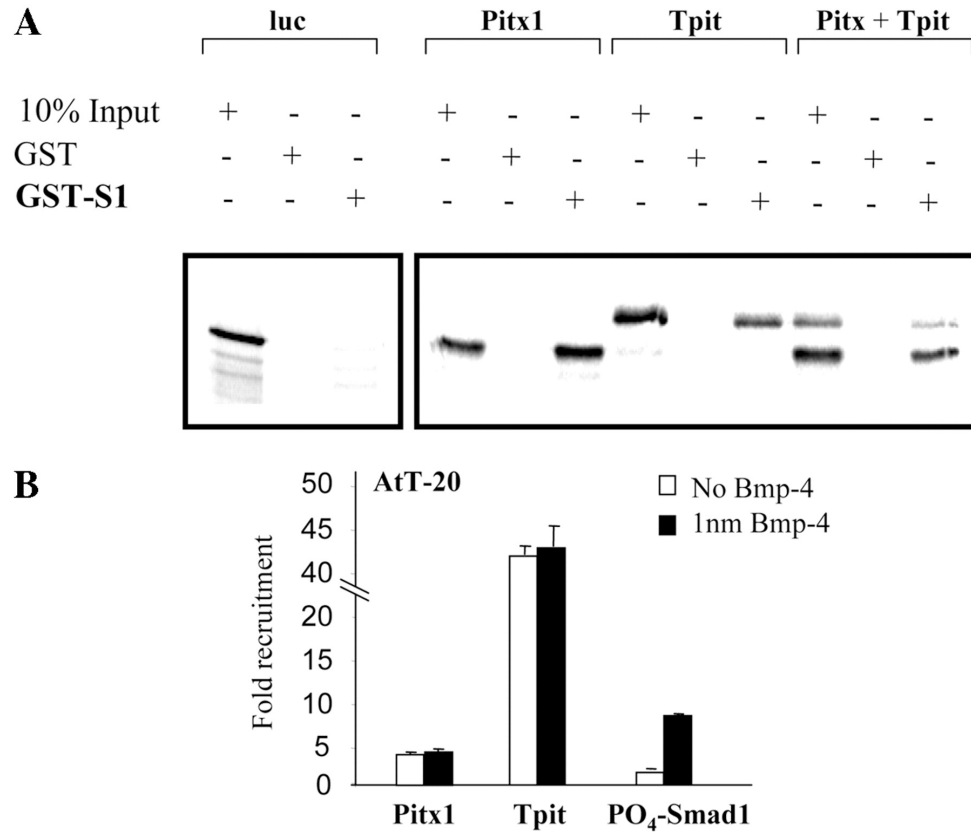
**Fig. A1.4 Inhibitory Smad6 and Smad7 Reverse BMP/Smad-Dependent POMC Repression**



**Fig. A1.5 BMP Signals Target Pitx1 and Tpit Regulatory Elements on POMC**

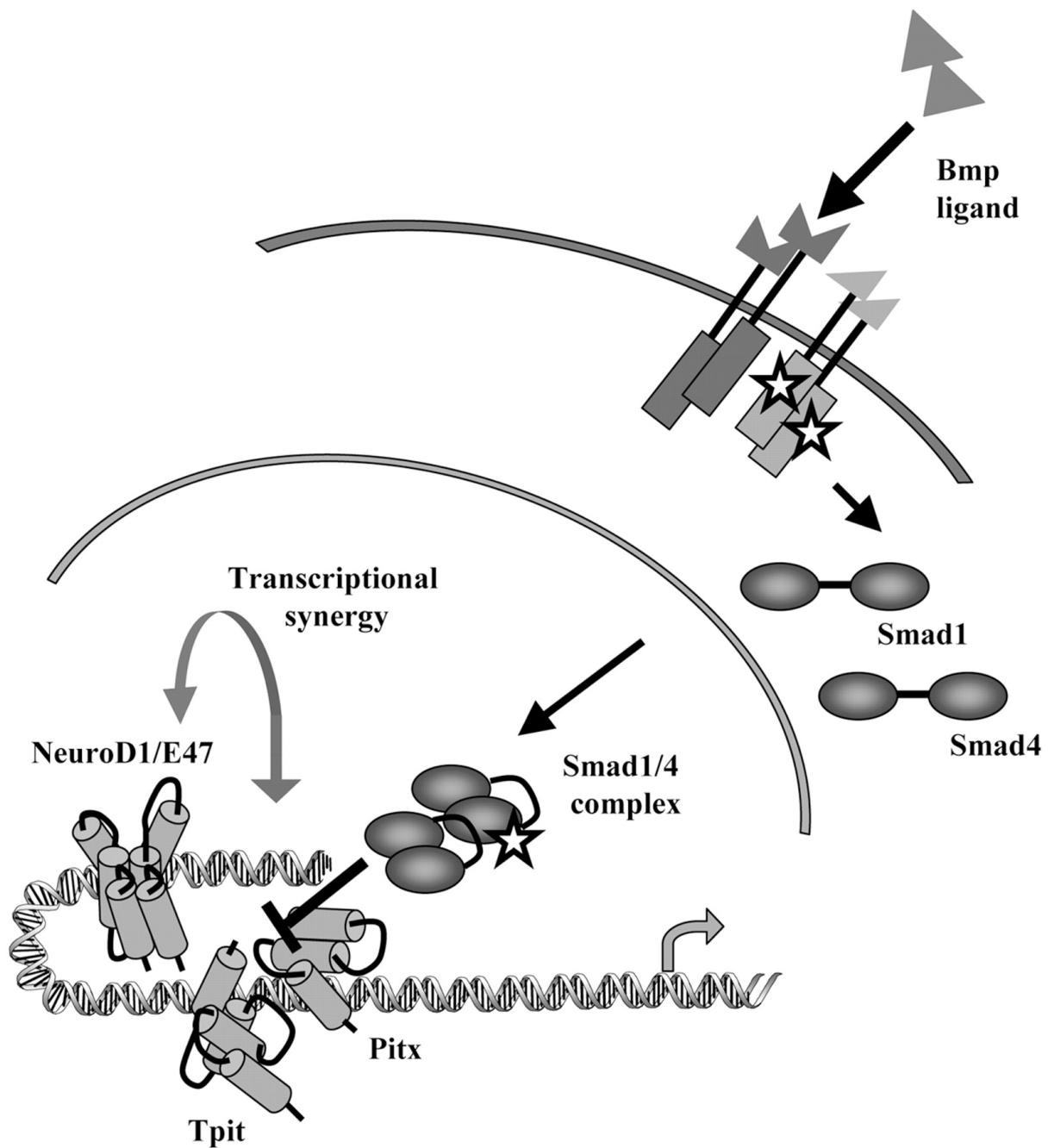


**Fig. A1.6 The Tpit/Pitx Regulatory Element Is Sufficient for BMP Repression without Changes in Tpit or Pitx Levels**



**Fig. A1.7 Smad1 Interacts with Pitx1 and Tpit and Is Recruited to the POMC Promoter**





**Fig. A1.8 Model for BMP-Induced Transcriptional Repression of POMC**

## **ANNEXE 2**

Le contenu de cette annexe est inclus dans cette thèse en raison du travail réalisé à titre de deuxième auteur. Il relate la régulation de l'initiation de l'expression de *MyoD* dans les myocytes du membre par le facteur de transcription Pitx2, via un l'enhancer distal (*core enhancer*). Plus encore, il est montré qu'il existe une dépendance prédominante alternative dans l'expression de *MyoD*, soit Pitx2 dans les membres, soit pour Myf5 dans le myotome; nonobstant, une compensation d'expression de MyoD, par Myf5 dans les membres et par Pitx2 dans le myotome, est révélée dans les doubles mutants. En plus d'être la première démonstration d'un facteur de transcription actuellement régulant le core enhancer, malgré sa découverte remontant à plus de 10ans, ce travail révèle aussi comment un gène peut être régulée par les mêmes régions régulatrices, par les mêmes facteurs, mais selon une dépendance qui est relative au contexte. En plus d'avoir été impliqué aux différentes étapes de la genèse et de l'écriture de ce travail, ma contribution spécifique a pris la forme de la figure A2.4 et A2.6I, où il est montré la sensibilité pour Pitx2 du core enhancer et de ses mutants des sites de liaisons aux Pitx, de même que la fixation de Pitx2 dans les membres et dans le myotome pendant le développement. Ses travaux ont d'ailleurs permis d'élaborer la figure A2.8B, où l'on illustre la nécessité différentielle des éléments de régulation du locus et où l'on suggère leur redondance fonctionnelle. Ce manuscrit a été publié dans la revue *Development* le 15 Novembre 2010 (**137**; 3847-3856) (doi: 10.1242/dev.053421)

**Annexe2 : PITX2 DEFINES ALTERNATE PATHWAYS ACTING THROUGH  
MyoD DURING LIMB AND SOMITIC MYOGENESIS**

**Short Title: Pitx2 in limb and somite myogenesis**

Aurore L'Honoré<sup>1</sup>, Jean-François Ouimette<sup>1</sup>, Marisol Lavertu-Jolin<sup>1</sup>, Jacques  
Drouin<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

Montréal QC H2W 1R7 CANADA

**Keywords:** muscle, differentiation, regulatory networks

**‡Corresponding author:** Jacques Drouin

Laboratoire de génétique moléculaire

Institut de recherches cliniques de Montréal

(IRCM)

110, avenue des Pins Ouest

Montréal QC H2W 1R7 CANADA

Tel: 514-987-5680 / Fax: 514-987-5575

## A1.1 ABSTRACT

The *MyoD* gene is part of the core regulatory network that governs skeletal myogenesis and acts as an essential determinant of the myogenic cell fate. While generic regulatory networks converging on this gene have been described, the specific mechanisms leading to *MyoD* expression in muscles of different ontology remain misunderstood. We now show that the homeobox gene *Pitx2* is required for initial activation of the *MyoD* gene in limb muscle precursors through direct binding of *Pitx2* to the *MyoD* core enhancer. Whereas *Myf5* and *Mrf4* are dispensable for limb muscle progenitor fate, inactivation of *Myf5(Mrf4)* in *Pitx2* mutants results in a drastic decrease of limb *MyoD* expression. Thus, *Pitx2* and *Myf5(Mrf4)* define parallel genetic pathways for limb myogenesis. We show a similar dependence on *Pitx2* and *Myf5(Mrf4)* in myotome, where *MyoD* expression is initially activated by *Myf5(Mrf4)*. In their absence, *MyoD* expression is eventually rescued by a *Pax3*-dependent mechanism. We now provide evidence that *Pitx2* contributes to the rescue of *MyoD* expression and that it acts downstream of *Pax3*. We thus propose that myogenic differentiation of somite-derived muscle cells relies on two parallel genetic pathways with the *Pitx2* pathway being of primary importance for limb myogenesis whereas the *Myf5(Mrf4)* pathway predominates in myotome. Muscle-specific wiring of regulatory networks composed of similar transcription factors thus underlies development of distinct skeletal muscles.

## A2.2 INTRODUCTION

Much that we have learned about muscle development has emphasized a general regulatory network driving myogenesis. The program for skeletal muscle development depends on a genetic network that is centered on a group of basic helix-loop-helix muscle regulatory factors (MRF) that control determination of myogenic progenitors and differentiation of myoblasts. The implication of this core genetic network in all skeletal muscles, together with the shared properties of MRFs, has led to a relatively simple view of muscle development. In contrast, different skeletal muscles clearly achieve different functions through intrinsic differences that are likely built into their developmental program. The molecular mechanisms that underlie the unique identity of different muscles remain elusive. We already have indications that two groups of body skeletal muscles have distinct mechanisms of formation although they both derive from somites. Indeed, most muscles of the trunk develop by growth, expansion and reorganization of the myotome (Cossu et al. 1996; Denetclaw et al. 1997; Tajbakhsh et al. 1996b) giving rise to back, intercostal and ventral body muscles (Christ et al. 1983; Christ et al. 2002). In contrast, several muscle groups including limb, diaphragm, intrinsic tongue and pharynx muscles do not go through a myotomal intermediate. Instead, myogenic progenitor cells of the hypaxial dermomyotome undergo an epithelial to mesenchymal transition and migrate as single cells to their respective destinations (Bladt et al. 1995; Christ et al. 1995; Mackenzie et al. 1998; Noden 1983; Ordahl et al. 1998). Finally, extra-ocular and branchiomeric

muscles do not derive from somites, but rather from cranial mesoderm (Noden et al. 2006).

In spite of these developmental differences, all skeletal muscles rely on the regulatory network involving MRFs. Thus, *Myf5* is expressed at the onset of myogenesis in the mouse embryo (Ott et al. 1991) when, together with *Mrf4*, it determines the myogenic cell fate (Kassar-Duchossoy et al. 2004). *MyoD* is subsequently expressed and can direct cells into the myogenic program in the absence of *Myf5* and *Mrf4* (Braun et al. 1992). *Myf5*, *Mrf4* and *MyoD* thus constitute the core regulatory network for myogenic determination. In their absence, precursor myoblast cells are lacking and skeletal muscles do not form (Kassar-Duchossoy et al. 2004; Rudnicki et al. 1993). By contrast, myogenin functions as an essential differentiation factor, as inactivation of its gene prevents formation of functional muscle fibres in vivo without affecting myoblast determination (Hasty et al. 1993; Nabeshima et al. 1993). Although this core network has been implicated in all skeletal myogenesis, various studies on hierarchical interactions between MRFs and with upstream transcription factors such as *Pax3* suggested that “wiring” of the myogenesis network is different in trunk, limbs or head muscles (Bajard et al. 2006; Kablar et al. 1999; Kassar-Duchossoy et al. 2004; Sambasivan et al. 2009). In particular, different transcription factors were shown to modulate the core network in these muscles (Dastjerdi et al. 2007; Grifone et al. 2005; Grifone et al. 2007; Mankoo et al. 1999).

The *Pitx2* gene was previously shown to be expressed during embryonic myogenesis (Diehl et al. 2006; Dong et al. 2006; L'Honoré et al. 2007; Shih et al. 2007b) of different skeletal muscle types, including extraocular, branchiomic, trunk and limb muscles. Whereas *Pitx2* was suggested to regulate *MRF* transcription in extraocular and branchiomic muscles (Diehl et al. 2006; Dong et al. 2006), it was also implicated in proliferation and survival of muscle progenitor cells in branchiomic muscles (Dong et al. 2006; Shih et al. 2007a). During body muscle development, *Pitx2* is expressed in muscle progenitor cells and early differentiating cells and its expression decreases at terminal differentiation (L'Honoré et al. 2007; Shih et al. 2007b). However, the precise role of *Pitx2* in those muscles is unknown.

*Pitx2* belongs to the *Pitx* gene family that includes three members in vertebrates. This family encodes paired-related homeodomain transcription factors that play major roles in early patterning and organogenesis. *PITX2* mutations have been associated with human Axenfeld-Rieger syndrome type I, an autosomal dominant disorder that includes dental hypoplasia, anterior segment eye defects, craniofacial dysmorphologies and heart defects as cardinal features (Gage et al. 1999; Kioussi et al. 2002; Kitamura et al. 1999; Lin et al. 1999; Lu et al. 1999; Semina et al. 1996). *Pitx2* is an essential effector for left-right asymmetry and it is essential for pituitary and craniofacial development (Gage et al. 1999; Lin et al. 1999). The mouse *Pitx2* gene produces three spliced isoforms (a, b and c) from two different promoters. Ablation of all three *Pitx2* isoforms in the mouse embryo causes lethality at



mid-gestation (E10.5-E13.5) with axial malformations, open body wall, heart malformations, laterality defects and arrest of multiple organ development.

In this report, we defined the role of *Pitx2* in both limb and myotome muscle development. We show that *Pitx2* is critical for the onset of *MyoD* gene expression in limb muscle progenitors and that it acts on the *MyoD* core enhancer. This action is later compensated by a *Myf5*-dependent mechanism. In contrast, initiation of *MyoD* expression in myotome is not dependent on *Pitx2* but we show that *Pitx2* acts in a *Pax3*-dependent genetic pathway parallel to *Myf5* and *Mrf4* such that *Pitx2* rescues *MyoD*-mediated myogenesis in their absence. We propose that the joint actions of *Myf5*, *MRF4* and *Pitx2* are critical for control of *MyoD* expression in muscles with different contributions of each gene depending on muscle ontology.

## A2.3 MATERIALS AND METHODS

### Animal handling and genotyping

All animal procedures were approved and conducted in accordance with IRCM Animal Ethics Review Committee regulations. *Pitx2*<sup>-/-</sup>, *Myf5*<sup>nLacZnLacZ</sup> and *Spotch* mice were described (Gage et al. 1999; Tajbakhsh et al. 1996a; Underhill et al. 1995). Genotyping was carried out by PCR using DNA isolated from umbilical cord/amniotic membrane of embryos or adult tail sections.

### Wholemout in situ hybridization and X-Gal staining, histology and immunohistochemistry

Mouse embryos were collected after natural overnight matings. Noon of the day on which a vaginal plug was detected was considered as E0.5. Embryos were staged more precisely by counting the number of somites posterior to the forelimb bud and scoring that first somite as 13 (Lewandoski et al. 2000). For X-Gal staining, embryos dissected in PBS were fixed for 30-45 min (depending on stage) with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, at 4°C. Embryos were then rinsed three times in PBS and stained with X-gal (1mg/mL) for 2 to 12 h at 30°C. Embryos were rinsed in PBS and post-fixed overnight in 4% PFA. Wholemount in situ hybridization was performed as described in the protocols from Dr. Janet Rossant's laboratory (<http://www.sickkids.ca/rossant/custom/protocols.asp>) using digoxigenin-

labeled riboprobes for *MyoD* and *myogenin* (plasmids kindly provided by S.Tajbakhsh).

Fluorescent co-immunohistochemistry and peroxidase immunohistochemistry were carried out as described previously (Lanctôt et al. 1999). The following primary antibodies were used: polyclonal anti-Pitx2, 1:200 (L'Honoré et al. 2007), goat anti- $\beta$ -galactosidase, 1:400 (Sigma), monoclonal anti-Pax3, 1:50 and monoclonal anti-myogenin, 1:50 (from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA52242), monoclonal anti-MyoD, 1:100 (Pharmingen, Mississauga ON CANADA), polyclonal anti-Ki67 1:100 (LabVision/Neomarkers, Fremont CA US). Secondary antibodies were coupled to biotin (anti-rabbit BA1000, or anti-mouse BA2000, Vector Labs, Burlington ON CANADA) and used at dilution of 1:150 or coupled to a fluorochrome, Alexa 488 or 555 (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad CA US) and used at dilution of 1:250. Streptavidin was coupled to peroxidase HRP (NEL750, NEN Life Science, Bridgewater NJ US) and used at 1:1000 or coupled to a fluorochrome, Alexa 488 or 555 (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad CA US) and used at 1:500. For immuno-histochemistry, reactions were performed using diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich, St-. Louis, MO US) as peroxidase substrate (L'Honoré et al. 2007) and slides were counterstained with Methyl Green. For immunofluorescence, slides were mounted using Mowiol.

## Plasmids and transfection assays

The *MyoD* CE and CE-mut luciferase reporter plasmids were constructed in pXP2 driven by the mouse *MyoD* proximal promoter (-285/+15 bp). The intact *MyoD* 258 bp CE was cloned upstream of this promoter and the CE-mut plasmids included mutations in either or both PRE as indicated in Figure 4A. The following oligonucleotides were used for site directed mutagenesis of the PitxRE sites: PRE1fwd: CAGCAGCTGGTCACAAAGCCA GTGAATTCCCCAGAGTGCTC; PRE1rev: GAGCACTCTGGGGAATTCCT GGCTTTGTGACCAGCTGCTG; PRE2fwd: GTGAATTCCCCAGAGT GCTCGACTTCAAACCCGTGACTCACAACAC; PRE2rev: GTGTTGTGAG TCACGGGTTTGAAGTCGAGCACTCTGGGGAATTCAC. The reporter plasmids were sequenced to ascertain the expected sequences.

CV-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptavidin antibiotics, and maintained in a humidified incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). For transfection, 40,000 cells were plated in 12-well-plates. Cells were transfected by the calcium phosphate co-precipitation method using a total of 1.5 µg of DNA (100 ng of CE-wt or CE-mut reporter plasmid, 0-50 ng of RSV-Pitx2 or empty RSV-expression vector, 50 ng of CMV-β-galactosidase as internal control and 1.3 µg of carrier DNA). Cells were harvested 24 h later using transfection lysis buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 0.5% NP-40, 1 mM DTT). Luciferase activity was assayed by injection of 100 µl of luciferine (0.5 mM in 100 mM Tris pH 8.0) to 100 µl of lysates using the Glomax luminometer (Promega, Madison WI US).

$\beta$ -gal activity was determined using the  $\beta$ -gal reporter gene Galacto-Star™ (TROPIX) assay system.

### Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitations were performed as described (Coulon et al. 2007) on either E12 hindlimbs, carefully dissected hindlimb muscles at E15 or E12 myotomes. Similar results were obtained using a Pitx2-specific antibody (L'Honoré et al. 2007) as well as an antibody that recognizes equally well the three Pitx factors. For ChIP analyses of the *MyoD* locus, the following primers were used in qPCR:

CEfwd: CCAGTTAATCTCCCAGAGTGCTCA; CErev: TGAGCTAGAGAAACCGGAGAA AC; DRRfwd: AGGTGCTAGTTGGATCCGGTTT; DRRrev: CATTTCAGCTCCCTTGGCTAGTCT; PRfwd: ACTCCTATGCTTTGCCTGGTCT; PRrev: ATACGCGGTAGCACTTG GCTAT. Enrichments were calculated relative to Q-PCR analyses of a control sequence within the *POMC* gene promoter that is not expressed in muscles or limbs: POMCfwd: TCGGAGTGGAATTACCTATGTGCG and POMCrev: TGGTTTCACAAGATATCACACTT TCCC. The  $\beta$ -actin and GAPDH loci were also used as negative control and yielded similar results.

## A2.4 RESULTS

Having previously shown (L'Honoré et al. 2007) that *Pitx2* is expressed before *MyoD* in *Pax3*-positive myogenic progenitors that have entered limb buds (Fig. A2.1A-C), we wanted to assess *Pitx2* expression in relation to the first expressed myogenic bHLH factor, *Myf5*. Using *Myf5<sup>nLacZ</sup>* heterozygous mice that carry a LacZ insertion into the *Myf5* locus (Tajbakhsh et al. 1994), we did co-labelling by immunofluorescence for *Pitx2* and  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) in E11.0 forelimb buds. Whereas all *Myf5*-expressing cells co-express *Pitx2* (Fig. A2.1D-F), some *Pitx2*-positive *Myf5*-negative cells ( $13\pm 1\%$ ,  $n=6$ ) are also observed (Fig. A2.1F, arrowhead). Since the expression of *MyoD* is more restricted at this developmental stage [Fig. A2.1G-J, and (L'Honoré et al. 2007)], these data show that *Pitx2* expression precedes activation of the limb myogenic program (Fig. A2.1K).

### ***MyoD* expression is decreased in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limb buds**

In order to assess a putative role of *Pitx2* in the myogenic program, we crossed the *Myf5<sup>nLacZ</sup>* indicator allele into the *Pitx2* null background. Expression of  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) in *Pitx2*<sup>+/-</sup> embryos is identical to *Pitx2*<sup>+/+</sup> embryos (data not shown) and thus heterozygote embryos were used throughout as control. Mice heterozygous for *Myf5<sup>nLacZ</sup>* did not show significant differences in  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) expression in E11.0 *Pitx2*<sup>-/-</sup> forelimb (FL) and hindlimb (HL) buds compared to *Pitx2*<sup>+/-</sup> embryos (Fig. A2.2A,B, and Fig. A2.S1A,B). The early expression of *Myf5* in limb progenitors thus appears to

be largely independent of *Pitx2*. In contrast, the onset of hindlimb bud *MyoD* expression (Fig. A2.2C) is markedly decreased in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos (Fig. A2.2D). A similar decrease was observed in FL buds at E10.5 (data not shown) and decreased *MyoD* transcripts are still observed in E11.5 FL and E12.5 HL (Fig. A2.2F compared to E; Fig. A2.S1C,D). However, *MyoD* expression is largely recovered in E12.5 FL buds (Fig. A2.2G,H). Since *myogenin* expression is dependent on *MyoD* during limb myogenesis (Sassoon et al. 1989; Wright et al. 1989), we assessed its expression by in situ hybridization in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos. We observed decreased *myogenin* transcripts in agreement with their purported dependence on *MyoD* (Fig. A2.2J compared to I). As shown for *MyoD* in E12.5 FL (Fig. A2.2G,H), similar patterns of *MyoD* and *myogenin* were observed in E13.0 FL and HL (Fig. A2.S1E,F and data not shown), suggesting full recovery of their expression.

### **Delayed myogenic differentiation in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limb buds**

The decreased *MyoD* expression in *Pitx2* mutant limb buds may be due to altered progenitor number or delayed myogenic differentiation. In order to assess these possibilities, we analyzed myogenic precursors and their proliferation status by co-labeling for Pax3 and Ki67. The number of Pax3-positive cells is unaltered in *Pitx2* mutant limb buds and their proliferation status is also unaffected (Fig. A2.S2 D-F compared to A-C). Also consistent with the unaltered *Myf5* expression pattern (Fig. A2.2A,B), the number of Myf5 and Pax3 double positive cells was similar in *Pitx2*-deficient limb buds (Fig. A2.S2M-O compared to G-I). However, co-labelling of myogenic precursors

with *Myf5* and *MyoD* revealed almost no double positive cells in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos (Fig.3D-F) compared to their control sibs (Fig. A2.3A-C). These data are thus consistent with a delay of *MyoD* activation. In order to quantify this delay, immuno-peroxidase labeling was performed on both E11.5 and E13.5 HL buds. The number of Pax3-positive cells was similar for both *Pitx2*<sup>-/-</sup> and *Pitx2*<sup>+/-</sup> HL buds at E11.5 (Fig. A2.3G,H,O), indicating that the number of progenitors that migrated into the mutant limb buds is not dependent on *Pitx2*. This is consistent with the onset of *Pitx2* expression after migration of limb bud progenitors (L'Honoré et al. 2007). As expected, the number of *MyoD* expressing cells was considerably decreased in E11.5 *Pitx2*<sup>-/-</sup> HL buds (Fig. A2.3I,J,O). However, quantitation of *MyoD*-positive cells in E13.5 HL buds revealed a complete recovery of the number *MyoD*-expressing cells (Fig. A2.3M-O). These results clearly indicate that the absence of *Pitx2* causes a delay in *MyoD* expression that is fully recovered by E13.5.

### ***Pitx2* acts directly on the *MyoD* core enhancer**

We considered the possibility that *Pitx2* may act directly on the *MyoD* gene. Appropriate spatio-temporal expression of *MyoD* is reproduced by a 24 kb fragment of 5' regulatory sequences that contains two enhancers called Core Enhancer (CE) (Faerman et al. 1995;Goldhamer et al. 1992;Goldhamer et al. 1995) and Distal Regulatory Region (DRR) (Asakura et al. 1995;Tapscott et al. 1992). While DRR activity is restricted to differentiated cells and maintains *MyoD* expression at foetal stages and post-natally (Asakura et al. 1995;Chen et al. 2002;Hughes et al. 1993;L'honoré et al. 2003), genetic



studies have ascribed initiation of *MyoD* expression to the CE (Chen et al. 2004; Kablar et al. 1999). The highly conserved 258 bp CE element is located about 20 kb upstream of the *MyoD* gene and it recapitulates the skeletal muscle pattern of *MyoD* expression during embryonic development (Faerman et al. 1995; Goldhamer et al. 1992; Goldhamer et al. 1995).

Interestingly, targeted deletion of the *MyoD* CE leads to a delay of *MyoD* expression in limbs (Chen et al. 2004) that is similar to that observed in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos (Fig. A2.2 and 3), suggesting that the *MyoD* CE may be a direct target of Pitx2. To assess this hypothesis, we analyzed the CE sequence (Goldhamer et al. 1995) and this revealed two well conserved putative Pitx binding sites (Fig. A2.4A). The sites (TAATCT and TAAGCT) are conserved between mouse and human (Fig. A2.S3A) and correspond to sequences previously shown to bind and be activated in response to Pitx1 and Pitx2 (Tremblay et al. 2000); further, the sites are in opposite orientation relative to each other as often observed in pituitary Pitx target genes (Tremblay et al. 1998). We used gel retardation assays to verify that Pitx2 binds these two sites (PRE1 and PRE2) *in vitro* (Fig. A2.S3B). Similar binding was observed at each site and a probe containing both sites showed cooperative binding. The *in vivo* occupancy of the CE was ascertained directly by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using HL buds from E12 and E15 embryos and anti-Pitx2 antibody. Significant recruitment of Pitx factors was observed both in E12 and E15 buds at the CE but not at the DRR (Fig. A2.4B). Interestingly, recruitment was also observed at about -600 bp in the promoter

region (PR) in agreement with the presence of a putative Pitx binding site at -615 bp. This site was tested by gel retardation and shown to bind Pitx2 (Fig. A2.S3B). The CE may thus be a direct target of Pitx factor action and this possibility was tested directly in co-transfection experiments in CV1 cells. The activity of reporters containing the CE inserted upstream of the proximal *MyoD* promoter exhibited dose-dependent activation in response to increasing amounts of Pitx2 and mutagenesis of the two putative Pitx binding sites in CE prevented this activation (Fig. A2.4C). Linker-scanning mutagenesis of the CE provided an in-depth functional analysis of this element (Kucharczuk et al. 1999) but surprisingly, it did not identify any essential sequence for *MyoD* limb expression. In particular, mutants LS-8 and LS-9 that respectively encompass the PRE1 and PRE2 did not affect limb activity. To assess the hypothesis that PRE1 and PRE2 may have redundant activities, we performed co-transfection experiments for Pitx2 activation of a wild-type or mutant CE reporter (Fig. A2.4D). Whereas mutagenesis of either site had a marginal effect, their combined mutation abrogated activation, highlighting their redundancy. These experiments support the model that Pitx2 is directly recruited to the *MyoD* CE to activate *MyoD* expression in early development, notwithstanding a possible action through other Pitx sites. The model is further supported by equivalent delays of limb *MyoD* expression observed in *Pitx2*<sup>-/-</sup> (Fig. A2.2) and mice deleted of the *MyoD* CE (Chen et al. 2004).

### ***Myf5* cooperates with *Pitx2* for limb *MyoD* expression**

The delay in *MyoD* expression observed in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limb buds thus appears to be due to the failure to activate the *MyoD* core enhancer. This delay is not compensated by the related *Pitx3* since the double *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Pitx3*<sup>-/-</sup> embryos show similar *Myogenin* expression patterns as the *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos (Fig. A2.S4). Since *Myf5* is activated independently of *Pitx2* during early myogenesis, we then tested the possibility that *Myf5* may contribute to *MyoD* recovery in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limbs. As previously reported (Tajbakhsh et al. 1997b), *MyoD* expression is not affected in limb buds of *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> mutant embryos indicating that *Myf5* and *Mrf4* (which is inactivated in cis in this mutant) are dispensable for non-myotomal *MyoD* expression (Fig. A2.5B,F compared to A,E). However, inactivation of *Myf5*(*Mrf4*) in the *Pitx2*<sup>-/-</sup> background resulted in almost complete loss of *MyoD* expression at E12.5 compared to *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> embryos (Fig. A2.5D,H compared to C,G). As for the *Pitx2* knockout (Fig. A2.2A-D), the double *Pitx2* and *Myf5*(*Mrf4*) loss-of-function did not appear to affect the number of limb muscle progenitors as assessed by  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) staining (Fig. A2.5I-L; Fig. A2.S4). The *Pitx2* and *Myf5*(*Mrf4*) double mutant is therefore specifically deficient in *MyoD* activation but not in formation or migration of precursors to the limb buds. In order to quantify the *Myf5* compensation of *Pitx2*, we counted the ratios of *MyoD*-positive cells relative to *Myf5*-positive cells (Fig. A2.5I-M). Whereas absence of *Myf5* and *Pitx2* resulted in complete loss of *MyoD* expression (L), the presence of one active *Myf5* allele prevented

this loss in about 60% of cells (K). These results clearly suggest that *Myf5* is acting in parallel to *Pitx2* for control of *MyoD* expression during early limb bud myogenesis.

### ***Pitx2* in myotome expression of *MyoD***

We previously showed *Pitx2* expression in myogenic cells of the myotome (L'Honoré et al. 2007). Myotome expression of *MyoD* (Fig. A2.2F and data not shown) and of *myogenin* (Fig. A2.2J) is not delayed in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos in contrast to limb muscle cells. We wanted to test the hypothesis that *Pitx2* and *Myf5/Mrf4* may also cooperate for *MyoD* expression in myotome. In *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> mutant embryos where both *Myf5* and *Mrf4* are absent, *MyoD* expression in myotome is delayed by approximately 2 days. Recovery of *MyoD* expression, which is dependent on *Pax3*, appears by E11.5 and is complete by E12.5 (Tajbakhsh et al. 1997b). Investigation of E12.5 *Pitx2*<sup>-/-</sup>; *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> embryos that are deficient in *Pitx2*, *Myf5* and *Mrf4*, showed an almost complete loss of *MyoD* myotome expression (Fig. A2.6D) compared to *Myf5* (Fig. A2.6B) and *Pitx2* (Fig. A2.6C) mutants (also Fig. A2.S6A-D). The remaining weak expression of *MyoD* in these double mutants was ascertained by immunohistofluorescence on E11.5 transverse thoracic sections. Staining for *MyoD* and *myogenin* revealed a small patch of positive cells in the most epaxial part of the myotome in *Pitx2*<sup>-/-</sup>; *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> embryos (Fig. A2.6G compared to E and S6G,H). The loss of *Pitx2* did not however affect the appearance of myotome cells as revealed by  $\beta$ -galactosidase staining (Fig. A2.6F,H; Fig. A2.S6E-H). *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos are

characterized by severe trunk distortion (Fig. A2.S6C, D). It is noteworthy that this distortion had no effect on *MyoD* expression in myotome of *Pitx2* mutants, clearly not supporting the idea of non cell-autonomous effects in the myotome of *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> embryos. In view of the many apparent targets of Pitx2 recruitment/action at the *MyoD* locus revealed by ChIP in limb buds (Fig. A2.4B), we also ascertained the presence of Pitx2 at the same sites in E12 myotome. The experiments clearly indicated recruitment of Pitx2 at the CE, DRR and -600 bp regions of the *MyoD* gene (Fig. A2.6I). These data thus suggest multiple targets for Pitx2 action on the *MyoD* gene and in particular, support the involvement of the DRR for myotome *MyoD* expression (Chen et al. 2002).

Since *Pax3* was involved in recovery of *MyoD* expression in myotome of *Myf5/Mrf4* mutants (Kassar-Duchossoy et al. 2004;Tajbakhsh et al. 1997b), we investigated a putative role of *Pax3* in myotome expression of *Pitx2*. We first excluded the possibility that *Pax3* might act directly on PREs using gel retardation (Fig. A2.S3B). The *Pax3* mutant *Spotch* mouse exhibits disorganized dermomyotome and it has slightly delayed myogenic differentiation. Analysis of these mutants at E11.5 when myogenesis resumes (as evidenced by myogenin expression, Fig. A2.7B,D) revealed a complete deficit of *Pitx2* expression (Fig. A2.7A,C); this deficit is restricted to myotome and is not observed in neighboring mesenchyme, indicating that *Pitx2* is downstream of *Pax3* during myotome myogenesis. If myotome expression of *Pitx2* is downstream of *Pax3*, inactivation of both genes should have no

greater effect than either mutation: this was indeed observed in myotome (Fig. A2.7E-G). These results indicate that *Pitx2* is a likely intermediate downstream of *Pax3* for *MyoD* recovery in *Myf5(Mrf4)* mutant myotomes. Interestingly, we observed a similar relationship between *Pax3* and *Pitx2* at shoulder girdle level. *MyoD* expression in a muscle opposite the forelimb is truncated in *Pax3*<sup>Sp/Sp</sup> embryos (Fig. A2.7H,I). This truncation is also observed in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos (Fig. A2.7K,M) and absence of both *Pax3* and *Pitx2* did not aggravate this truncation (Fig. A2.7H-J). As previously described, this truncation is not observed in *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> mutants (Fig. A2.7K,L) (Tajbakhsh et al. 1997b), but we now provide evidence that *MyoD* expression in this muscle is also dependent on both *Pitx2* and *Myf5/Mrf4* pathways as the double mutant is almost completely devoid of *MyoD* (Fig. A2.7K-N). These data are consistent with *Pax3* regulation of *Pitx2* expression in both myotome and shoulder girdle, and with a primary role of the *Pax3/Pitx2* pathway in the shoulder girdle.

## A2.5 DISCUSSION

Many studies have supported the idea that one core regulatory MRF is sufficient to initiate myogenesis in skeletal muscles of various origins. Whereas *Myf5/Mrf4* are primarily involved in initial determination of the myogenic program, it appears that *MyoD* is the point of convergence for regulatory pathways that drive myogenic differentiation. Recent work has identified *Pitx2* as an upstream regulator for MRF expression in extra ocular muscles (Diehl et al. 2006) and *Pitx2* was also shown to cooperate with *Tbx1* for activation of the muscle fate in the pharyngeal arch (Dong et al. 2006; Shih et al. 2007a). The present work identifies a critical role for *Pitx2* in control of somite-derived myogenesis, placing this gene either downstream of *Pax3* in myotome and in a parallel pathway to *Myf5/Mrf4* in limbs where *Pitx2* directly controls onset of *MyoD* expression. Taken collectively, these data support models that include *Pitx2*-dependent pathways in all skeletal muscles (Fig. A2.8A).

The present work documented a delay of limb bud *MyoD* expression in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos. This delay is similar to the 1-2-day delay of *MyoD* activation in limb buds of *MyoD* CE-deleted mice. Accordingly, we show *Pitx2* binding to the *MyoD* CE in embryonic limb buds by ChIP and binding site-dependent transcriptional activation by *Pitx2*. Thus, the *MyoD* core enhancer is the likely target for *Pitx2* control of *MyoD* expression during limb myogenesis. CE-deleted mutant embryos are characterized by delayed *MyoD* expression not only in limbs but also in muscle precursors of the first branchial arch (Chen et

al. 2004). During branchiomic development, *Pitx2* is expressed both in surface ectoderm and in the mesodermal core of the first arch, and interestingly conditional inactivation of *Pitx2* in pharyngeal mesoderm results in severe reduction of *MyoD* and *myogenin* expression (Dong et al. 2006). The CE may thus also constitute a *cis* target for *Pitx2*-dependent *MyoD* expression during branchiomic myogenesis. In both *Pitx2*<sup>-/-</sup> and *CE*<sup>loxP/loxP</sup> mutants, the functional consequence of delayed *MyoD* expression was a delay in muscle differentiation as revealed by *myogenin* expression. This defect is reminiscent (somewhat less pronounced) of delayed limb and branchial arch differentiation observed in *MyoD*<sup>-/-</sup> embryos (Kablar et al. 1997). Collectively, these data suggest similar regulatory networks for *Pitx2*-dependent *MyoD* activation in *MyoD*-dependent lineages of the head and limb.

This similarity contrasts with *Myf5/Mrf4* regulation of *MyoD*. Indeed, while *MyoD* expression is delayed in myotome of *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> mutant embryos, it is unaffected in limb buds and branchial arch-derived myogenic cells (Kablar et al. 1997; Tajbakhsh et al. 1997b). Consistent with this, CE activity is not affected in *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> limb buds nor in branchial arch, suggesting that *Myf5* is dispensable for both CE activity and early *MyoD* expression in these lineages (Chen et al. 2004). The present work nonetheless supports a role of *Myf5(Mrf4)* in limb *MyoD* expression and positioned these two genes in a parallel pathway relative to *Pitx2* (Fig. A2.8A).

*MyoD* regulation has been studied extensively in myotomal lineages and supported models in which *Myf5*, *Mrf4*, as well as *Pax3*, operate upstream



of *MyoD* (Tajbakhsh et al. 1997a). In *Myf5<sup>nLacZ/nLacZ</sup>* mutant embryos, *MyoD* expression is delayed by approximately 2 days in myotome (Kablar et al. 1997; Tajbakhsh et al. 1997b) and this delay appeared to be due to developmental arrest of myogenic progenitors along the dermomyotome (Tajbakhsh et al. 1996b). Using allelic series of *Myf5* mutants that differentially affect *Mrf4* expression together with *Mrf4* mutants, it was shown that *Myf5<sup>nLacZ/nLacZ</sup>* and *Myf5;Mrf4* mutants exhibit the same delayed *MyoD* expression, supporting the conclusion that both *Mrf4* and *Myf5* act upstream of *MyoD* in myotomes (Kassar-Duchossoy et al. 2004). This dependence on *Myf5* and *Mrf4* was transient and the recovery of *MyoD* expression operates through a *Pax3*-dependent mechanism although this may be mediated through a secondary factor (Tajbakhsh et al. 1997b). We complemented this model by positioning *Pitx2* under control of *Pax3* (Fig. A2.8A). Since the double mutant for *Pitx2* and *Myf5/Mrf4* is deficient in myotome expression of *MyoD*, *Pitx2* is a likely intermediate for *Pax3* control of *MyoD*. Thus, *Pitx2* defines a complementary pathway for activation of the myogenic pathway through *MyoD*.

Regulation of *MyoD* expression is complex: although it can be recapitulated by the complementary activities of the CE and DRR, various transgenic studies have concluded that both enhancers are dispensable either for *Myf5* regulation or *Pax3*-dependant expression of *MyoD* in myotomal lineages (Chen et al. 2002; Chen et al. 2004; Kucharczuk et al. 1999). With the exception of E-boxes, the two enhancers lack cis-motifs known to regulate

muscle genes during development. Taken together, these observations suggest a functional redundancy in cis-regulatory mechanisms controlling *MyoD* expression. Such redundancy of transcriptional control mechanisms appears to be a frequent feature of developmental regulatory pathways as elegantly shown recently in *Drosophila* larvae (Frankel et al. 2010) and the action of Pitx2 on the *MyoD* gene is consistent with this model (Fig. A2.8B). Whereas the CE appears to be the predominant site of action for *MyoD* expression in limb buds, ChIP analyses also revealed Pitx2 recruitment in the -600 bp PR region, but not at the DRR. This proximal site, which is close to documented sites for Pax3 and FoxO3 (Hu et al. 2008), may thus also contribute to expression. Further, similar ChIP analyses in myotome revealed Pitx2 at the three *MyoD* regulatory regions (CE, DRR and PR). Pitx2 recruitment to the DRR was unexpected as no consensus Pitx binding site is present in this enhancer. Pitx2 may be indirectly recruited to the DRR through its interaction with another transcription factor. Serum Response Factor (SRF) is a likely candidate since the DRR contains a SRF binding CArG element previously shown to be required for *MyoD* expression in skeletal myoblasts (L'honoré et al. 2003) and Pitx2 has been shown to interact with SRF and increase its association with DNA (Shang et al. 2008).

In *Pitx2;Myf5(Mrf4)* mutants, progenitor cells are still present at E11.5-E12.5 in both myotome and limb, as revealed by  $\beta$ -galactosidase staining but most of these cells do not express MyoD or myogenin. This situation is reminiscent but somewhat less pronounced than in *Myf5;Mrf4;MyoD* triple

mutants, where in absence of all myogenic bHLH, somitic progenitors cells fail to commit to the muscle lineage. Those progenitors have been reported to assume nonmuscle fates in trunk and limbs, being first integrated in cartilage primordia, but then to undergo apoptosis. This death occurs several days after their birth (E13.5) (Kablar et al. 1999; Kablar et al. 2003) and may be linked to their failure to commit. It is thus tempting to speculate that a similar mechanism occurs in *Pitx2;Myf5(Mrf4)* mutants: analysis of those mutants at E12.5 revealed a slight increase of apoptosis in myotome and limb compared to control. Unfortunately, the early lethality (E13) of *Pitx2;Myf5(MRF4)* mutants did not allow us to perform analyses at later stages.

As reported for *Pax3;Myf5;Mrf4* mice (Kassar-Duchossoy et al. 2004; Tajbakhsh et al. 1997b), we note an incomplete penetrance and residual *MyoD* and *myogenin* expression in *Pitx2;Myf5(Mrf4)* embryos leading to sporadic myogenesis in the myotome (particularly in the most epaxial part) and in the limb (dorsal mass). This could be due to compensation by another factor. Likely candidates include *Pax7* that is expressed in precursors from E11.5 (Kassar-Duchossoy et al. 2005; Relaix et al. 2005), *Tbx1* that is initially expressed in dorsal masses of the limbs (Dastjerdi et al. 2007) and reminiscent of residual *MyoD* expression observed in *Pitx2;Myf5(Mrf4)* mutants, and at last *Pitx3* that is expressed after *Pitx2* during embryonic myogenesis (L'Honoré et al. 2007). *Pitx3* does not compensate for loss of *Pitx2* towards *myogenin* or *MyoD* expression in limbs (Fig. A2.S4) but we cannot exclude that it could exert its action in absence of both *Pitx2* and *Myf5*.

These seemingly *Pitx2*-independent myogenic cells may represent a subpopulation that is regulated by yet another alternate myogenic pathway.

The present work delineated differential requirements for *Pitx2* in migratory versus non-migratory somite-derived myogenic cells. These body myogenic cells share a critical dependence on *Pax3* for their fate in contrast to extra-ocular and branchial arch muscles (Sambasivan et al. 2009) that do not express *Pax3*. It is noteworthy that *Pitx2* is complementary to *Myf5/Mrf4* in *Pax3*-dependent body muscles, whereas it is genetically upstream of the MRF core regulatory network in *Pax3*-independent head muscles. Thus, all skeletal muscles include *Pitx2* in their genetic program. Different muscles have evolved the striking ability to co-opt selected elements of a core regulatory network together with a complementary genetic pathway in order to direct similar, yet distinct, muscle cell fates at different anatomical locations. *Pitx* transcription factors were shown to interact physically and functionally with factors of multiple structural families, including POU-homeo factors (Szeto et al. 1996), bHLH factors (Poulin et al. 2000), Smads (Nudi et al. 2005), Tbox (Lamolet et al. 2001), Egr and nuclear receptors (Tremblay et al. 1999) and LEF1 (Vadlamudi et al. 2005). In view of these multiple interactions, the implication of *Pitx2* in the myogenic program provides numerous alternative mechanisms to modulate unique muscle identities in limb, trunk, pharyngeal or ocular muscles.

## A2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Phil Gage and Sally Camper who provided the *Pitx2* mutant mice, to Sharaghim Tajbakhsh and Margaret Buckingham, Institut Pasteur, Paris, who provided the *Myf5<sup>nLacZ</sup>* mice and to Alan Underhill, Univ. Alberta for the *Spotch* mice. The help of Philippe Daubas for gel retardation is greatly appreciated. We thank Catherine Couture for plasmid constructions, Annie Vallée of the IRCM Histology Core for her precious help in tissue and section preparations and to Julie D'Amours and Isabelle Brisson for animal husbandry. The secretarial assistance of Lise Laroche was highly appreciated. This work was supported by a postdoctoral Fellowship from Fondation de la recherche médicale to A.L. and by grants to J.D. from the Canadian Institutes of Health Research (MT-15081).

## A2.7 REFERENCE LIST

Asakura,A., Lyons,G.E., and Tapscott,S.J. (1995). The regulation of MyoD gene expression: conserved elements mediate expression in embryonic axial muscle. *Dev.Biol.* 171: 386-398.

Bajard,L., Relaix,F., Lagha,M., Rocancourt,D., Daubas,P., and Buckingham,M.E. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes Dev* 20: 2450-2464.

Bladt,F., Riethmacher,D., Isenmann,S., Aguzzi,A., and Birchmeier,C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376: 768-771.

Braun,T., Rudnicki,M.A., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71: 369-382.

Chen,J.C. and Goldhamer,D.J. (2004). The core enhancer is essential for proper timing of MyoD activation in limb buds and branchial arches. *Dev.Biol.* 265: 502-512.

Chen,J.C., Ramachandran,R., and Goldhamer,D.J. (2002). Essential and redundant functions of the MyoD distal regulatory region revealed by targeted mutagenesis. *Dev.Biol.* 245: 213-223.

Christ,B. and Brand-Saberi,B. (2002). Limb muscle development. *Int.J.Dev.Biol.* 46: 905-914.

Christ,B., Jacob,M., and Jacob,H.J. (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat.Embryol.(Berl)* 166: 87-101.

Christ,B. and Ordahl,C.P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat.Embryol.(Berl)* 191: 381-396.

Cossu,G., Kelly,R., Tajbakhsh,S., Di Donna,S., Vivarelli,E., and Buckingham,M. (1996). Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* 122: 429-437.

Coulon,V., L'Honoré,A., Ouimette,J.F., Dumontier,É., van den Munckhof,P., and Drouin,J. (2007). A muscle-specific promoter directs *Pitx3* gene expression in early muscle cells. *J.Biol.Chem.* 282: 33192-33200.

Dastjerdi,A., Robson,L., Walker,R., Hadley,J., Zhang,Z., Rodriguez-Niedenfuhr,M., Ataliotis,P., Baldini,A., Scambler,P., and Francis-West,P. (2007). Tbx1 regulation of myogenic differentiation in the limb and cranial mesoderm. *Dev.Dyn.* 236: 353-363.

Denetclaw,W.F.Jr., Christ,B., and Ordahl,C.P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* 124: 1601-1610.

Diehl,A.G., Zarepari,S., Qian,M., Khanna,R., Angeles,R., and Gage,P.J. (2006). Extraocular muscle morphogenesis and gene expression are regulated by Pitx2 gene dose. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 47: 1785-1793.

Dong,F., Sun,X., Liu,W., Ai,D., Klysik,E., Lu,M.F., Hadley,J., Antoni,L., Chen,L., Baldini,A. et al. (2006). Pitx2 promotes development of splanchnic mesoderm-derived branchiomic muscle. *Development* 133: 4891-4899.

Faerman,A., Goldhamer,D.J., Puzis,R., Emerson,C.P., Jr., and Shani,M. (1995). The distal human myoD enhancer sequences direct unique muscle-specific patterns of lacZ expression during mouse development. *Dev.Biol.* 171: 27-38.

Frankel,N., Davis,G.K., Vargas,D., Wang,S., Payre,F., and Stern,D.L. (2010). Phenotypic robustness conferred by apparently redundant transcriptional enhancers. *Nature* 466: 490-493.

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

Goldhamer,D.J., Brunk,B.P., Faerman,A., King,A., Shani,M., and Emerson,C.P., Jr. (1995). Embryonic activation of the myoD gene is regulated by a highly conserved distal control element. *Development* 121: 637-649.

Goldhamer,D.J., Faerman,A., Shani,M., and Emerson,C.P., Jr. (1992). Regulatory elements that control the lineage-specific expression of myoD. *Science* 256: 538-542.



Grifone,R., Demignon,J., Giordani,J., Niro,C., Souil,E., Bertin,F., Laclef,C., Xu,P.X., and Maire,P. (2007). Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Dev Biol* 302: 602-616.

Grifone,R., Demignon,J., Houbron,C., Souil,E., Niro,C., Seller,M.J., Hamard,G., and Maire,P. (2005). Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* 132: 2235-2249.

Hasty,P., Bradley,A., Hsi Morris,J., Edmondson,D.G., Venuti,J.M., Olson,E.N., and Klein,W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364: 501-506.

Hu,P., Geles,K.G., Paik,J.H., DePinho,R.A., and Tjian,R. (2008). Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Dev Cell* 15: 534-546.

Hughes,S.M., Taylor,J.M., Tapscott,S.J., Gurley,C.M., Carter,W.J., and Peterson,C.A. (1993). Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development* 118: 1137-1147.

Kablar,B., Krastel,K., Tajbakhsh,S., and Rudnicki,M.A. (2003). Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Dev.Biol.* 258: 307-318.

Kablar,B., Krastel,K., Ying,C., Asakura,A., Tapscott,S.J., and Rudnicki,M.A. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development* 124: 4729-4738.

Kablar,B., Krastel,K., Ying,C., Tapscott,S.J., Goldhamer,D.J., and Rudnicki,M.A. (1999). Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. *Dev.Biol.* 206: 219-231.

Kassar-Duchossoy,L., Gayraud-Morel,B., Gomes,D., Rocancourt,D., Buckingham,M., Shinin,V., and Tajbakhsh,S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* 431: 466-471.

Kassar-Duchossoy,L., Giacone,E., Gayraud-Morel,B., Jory,A., Gomes,D., and Tajbakhsh,S. (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19: 1426-1431.

Kioussi,C., Briata,P., Baek,S.H., Rose,D.W., Hamblet,N.S., Herman,T., Ohgi,K.A., Lin,C., Gleiberman,A., Wang,J. et al. (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111: 673-685.

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

Kucharczuk,K.L., Love,C.M., Dougherty,N.M., and Goldhamer,D.J. (1999). Fine-scale transgenic mapping of the MyoD core enhancer: MyoD is regulated by distinct but overlapping mechanisms in myotomal and non-myotomal muscle lineages. *Development* 126: 1957-1965.

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

L'honoré,A., Lamb,N.J., Vandromme,M., Turowski,P., Carnac,G., and Fernandez,A. (2003). MyoD distal regulatory region contains an SRF binding CArG element required for MyoD expression in skeletal myoblasts and during muscle regeneration. *Mol.Biol Cell* 14: 2151-2162.

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.

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

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.

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

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.

Mackenzie,S., Walsh,F.S., and Graham,A. (1998). Migration of hypoglossal myoblast precursors. *Dev.Dyn.* 213: 349-358.

Mankoo,B.S., Collins,N.S., Ashby,P., Grigorieva,E., Pevny,L.H., Candia,A., Wright,C.V., Rigby,P.W., and Pachnis,V. (1999). Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* 400: 69-73.

Nabeshima,Y., Hanaoka,K., Hayasaka,M., Esumi,E., Li,S., and Nonaka,I. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364: 532-535.

Noden,D.M. (1983). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev.Biol.* 96: 144-165.

Noden,D.M. and Francis-West,P. (2006). The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Dev.Dyn.* 235: 1194-1218.

Nudi,M., Ouimette,J.F., and Drouin,J. (2005). Bone morphogenic protein (Smad)-mediated repression of proopiomelanocortin transcription by interference with Pitx/Tpit activity. *Mol.Endocrinol.* 19: 1329-1342.

Ordahl,C.P. and Williams,B.A. (1998). Knowing chops from chuck: roasting myoD redundancy. *Bioessays* 20: 357-362.

Ott,M.O., Bober,E., Lyons,G., Arnold,H., and Buckingham,M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111: 1097-1107.

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

Relaix,F., Rocancourt,D., Mansouri,A., and Buckingham,M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435: 948-953.

Rudnicki,M.A., Schnegelsberg,P.N., Stead,R.H., Braun,T., Arnold,H.H., and Jaenisch,R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359.

Sambasivan,R., Gayraud-Morel,B., Dumas,G., Cimper,C., Paisant,S., Kelly,R.G., and Tajbakhsh,S. (2009). Distinct regulatory cascades govern

extraocular and pharyngeal arch muscle progenitor cell fates. *Dev.Cell* 16: 810-821.

Sassoon,D., Lyons,G.E., Wright,W.E., Lin,V., Lassar,A., Weintraub,H., and Buckingham,M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341: 303-307.

Semina,E.V., 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. et al. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat.Genet.* 14: 392-399.

Shang,Y., Yoshida,T., Amendt,B.A., Martin,J.F., and Owens,G.K. (2008). Pitx2 is functionally important in the early stages of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Cell Biol* 181: 461-473.

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

Shih,H.P., Gross,M.K., and Kioussi,C. (2007b). Expression pattern of the homeodomain transcription factor Pitx2 during muscle development. *Gene Expr.Patterns.* 7: 441-451.

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

Tajbakhsh,S., Bober,E., Babinet,C., Pournin,S., Arnold,H., and Buckingham,M. (1996a). Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Dev.Dyn.* 206: 291-300.

Tajbakhsh,S. and Buckingham,M.E. (1994). Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91: 747-751.

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

Tajbakhsh,S., Rocancourt,D., and Buckingham,M. (1996b). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* 384: 266-270.

Tajbakhsh,S., Rocancourt,D., Cossu,G., and Buckingham,M. (1997b). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127-138.

Tapscott,S.J., Lassar,A.B., and Weintraub,H. (1992). A novel myoblast enhancer element mediates MyoD transcription. *Mol.Cell Biol* 12: 4994-5003.

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 b gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* 19: 2567-2576.

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

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

Underhill,D.A., Vogan,K.J., and Gros,P. (1995). Analysis of the mouse *Spotch*-delayed mutation indicates that the Pax-3 paired domain can influence homeodomain DNA-binding activity. *Proc.Natl Acad.Sci.USA* 92: 3692-3696.

Vadlamudi,U., Espinoza,H.M., Ganga,M., Martin,D.M., Liu,X., Engelhardt,J.F., and Amendt,B.A. (2005). PITX2, beta-catenin and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter. *J Cell Sci.* 118: 1129-1137.

Wright,W.E., Sassoon,D.A., and Lin,V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617.



## A2.8 FIGURE LEGENDS

### Figure 1. Limb expression of *Pitx2* precedes *Myf5* and *MyoD*.

(A-I) Expression of *Pitx2* (green) (A, C, D, F, G, I), *Pax3* (red) (B, C),  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*, red) (E, F) and *MyoD* (red) (H, I) revealed by co-immunofluorescence on transverse sections of forelimbs from E11.0 *Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* embryos. Arrows indicate *Pitx2*-positive cells that do not express *Myf5* ( $\beta$ -galactosidase). This population represents  $13\% \pm 1\%$  ( $n=6$ ) of the total number of cells expressing *Pitx2*. (J) Quantitation of *Pitx2*-positive cells expressing the indicated myogenic markers. (K) Schematic illustration of *Pitx2*, *Myf5*, *MyoD* and *myogenin* expression in forelimb (filled boxes) and hindlimb (clear boxes) during mouse embryonic development.

### Figure 2. *MyoD* and *myogenin*, but not *Myf5*, expression are deficient in limbs of *Pitx2* mutant embryos.

(A, B)  $\beta$ -galactosidase staining of E11.0 hindlimb buds from *Pitx2<sup>+/-</sup>;Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (A) and *Pitx2<sup>-/-</sup>;Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (B) embryos. (C-J) Wholemount in situ hybridization at hindlimb (C, D) or forelimb level (E-J) of *Pitx2<sup>+/-</sup>;Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (C, E, G, I) and *Pitx2<sup>-/-</sup>;Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (D, F, H, J) embryos at E11.5 (C-F), E12.5 (G, H) or E11.25 (I, J), hybridized with *MyoD* (C-H) or *myogenin* (I, J) probes. Complementary data are presented in Figure S1.

**Figure 3. Limb MyoD deficiency is transient in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos.**

(A-F) Co-staining by immunofluorescence for MyoD (red) (A, C, D, F) or  $\beta$ -galactosidase (Myf5, green) (B, C, E, F) on transverse sections of hindlimb buds from E11.5 *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (A-C) and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (D-F) embryos. (G-N) Immunohistochemical analyses of Pax3 (G, H), MyoD (I, J, M, N) or Pitx2 (K, L) on transverse sections of hindlimb buds from *Pitx2*<sup>+/-</sup> (G, I, K, M) and *Pitx2*<sup>-/-</sup> (H, J, L, N) embryos at E11.5 (G-L) and E13.5 (M, N). (O) Quantification of the number ( $\pm$  s.d.) of Pax3 or MyoD positive cells in entire hindlimb buds from *Pitx2*<sup>+/-</sup> and *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos at E11.5 and E13.5. Figure S2 provides cell number and proliferation controls for these experiments.

**Figure 4. Pitx2 directly regulates *MyoD* expression through binding of the core enhancer (CE).**

(A) Schematic representation of *MyoD* gene regulatory regions comprising a minimal promoter called Proximal Regulatory Region (PRR) (Tapscott et al. 1992), and two enhancers, namely the Core Enhancer (CE) (Goldhamer et al. 1992) and the Distal Regulatory Region (DRR) (Tapscott et al. 1992). The 258 bp CE contains two putative consensus Pitx binding sites (PRE1 and PRE2). A third putative Pitx binding site (PRE3) is present at -615 bp in the promoter region (PR) close to the PRR. The consensus PitxRE was obtained from the Genomatix database. Sequences of the three PRE are shown together with mutations used in transactivation assays (in red). (B)

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis for the presence of Pitx2 at the indicated *MyoD* regulatory sequences were performed on chromatin isolated from hindlimb buds of wild-type E12 or E15 embryos. The histogram shows enrichments ( $\pm$  s.e.m., n=3) obtained at CE, DRR and PR relative to the *POMC* promoter used as reference. (C) Activation of CE by Pitx2. CV1 cells that do not express Pitx transcription factors were transfected with a luciferase reporter construct containing *MyoD* CE fused to PRR sequences (CE-luc). Dose response is shown for co-transfection of increasing amounts of Pitx2 expression plasmid as indicated. The double PRE1/2 mutations prevented Pitx2 activation. (D) Effect of single or joint PRE site mutation on reporter activation by Pitx2. Results are the average of three independent experiments, each performed in duplicates ( $\pm$  s.e.m.).

**Figure 5. *Myf5* compensates functionally for *MyoD* expression in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limbs.**

(A-H) Dorsal views of forelimb (A-D) and hindlimb (E-H) buds from *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (A, E), *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (B, F), *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (C, G) and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (D, H) embryos at E12.5 stained by wholemount in situ hybridization for *MyoD* transcripts. (I-J) Co-staining by immunofluorescence for  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*, green) or *MyoD* (red) on transverse sections of forelimb buds from E11.5 *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (I), *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> (J) *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (K) and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> (L) embryos.

(M) Quantification of the percentage of *Myf5* ( $\beta$ -galactosidase)-positive cells co-expressing *MyoD* in forelimb buds from embryos analyzed in I-L. See also Figure S3 for controls of  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) expression.

**Figure 6. *Pitx2* is sufficient for hypaxial myotome expression of *MyoD* in absence of *Myf5*(*Mrf4*).**

(A-D) Dorsal views of interlimb myotomes from *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (A), *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (B), *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> (C) and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (D) embryos at E12.5 stained by wholemount in situ hybridization for *MyoD* transcripts. The black arrows point to hypaxial myotome. See also Figure S4A, B. (E-H) Staining by immunofluorescence for *MyoD* (red, E, G) or  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*, green, F, H) on transverse sections of thoracic somites from E11.5 *Pitx2*<sup>+/+</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (E, F) and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (G, H) embryos. The white arrow points to hypaxial myotome and the asterisk indicates non-specific staining of red blood cells. See also Figure S6G, H for Myogenin expression. (I) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis for the presence of *Pitx2* at the indicated *MyoD* regulatory sequences were performed on chromatin isolated from dissected myotome of wild-type E12 embryos. The histogram shows enrichments ( $\pm$ s.e.m., n=3) obtained at CE, DRR and PR relative to the *POMC* promoter used as reference.

**Figure 7. Cooperation between *Pax3/Pitx2* and *Myf5/Mrf4* pathways for *MyoD* expression in myotome and shoulder girdle muscle.**

(A-D) Immunohistochemical analyses of Pitx2 and myogenin expression on transverse sections of thoracic somites from E11.5 *Pax3*<sup>Sp/+</sup> and *Pax3*<sup>Sp/Sp</sup> embryos. The black arrows point to unaffected Pitx2 expression in mesenchyme while dotted lines indicate myotomes. (E-N) Wholemound in situ hybridization for *MyoD* performed on E12.0 (E-J) and E12.5 (K-N) embryos of the indicated genotypes. (E-G) Bracket indicates width of myotomes. (H-N) Forelimb buds are outlined with black dotted lines whereas white dotted lines indicate shoulder girdle muscle; further, the extent of this shoulder muscle is indicated by a white bar. Second branchial arch muscles affected by *Pitx2* mutation (Shih et al. 2007a) are outlined with green line. Asterisk indicates first branchial arch that is absent in *Pitx2* mutant (Dong et al. 2006). OV, otic vesicle.

**Figure 8. MyoD gene regulation.**

(A) Gene networks controlling *MyoD* expression in limb, myotome, extra-ocular and pharyngeal arch muscles. *Pitx2* has a critical role in initiation of *MyoD* expression in limb buds, but not in myotome where *Myf5(Mrf4)* play a predominant role. Nonetheless, *Pitx2* and *Myf5(Mrf4)* are jointly contributing to *MyoD* expression in both limb and myotome as revealed by their compound mutants. *Pax3* is required for *Pitx2* expression in myotome. In head (extra-

ocular and 1<sup>st</sup> pharyngeal arch) muscles that do not express *Pax3*, *Pitx2* acts upstream of *Myf5/Mrf4* (rather than in parallel), and in association with *Tbx1* in arches (adapted from (Sambasivan et al. 2009)). (B) Differential recruitment of *Pitx2* to different regions of the *MyoD* gene depending on muscle ontology in support of functional redundancy models (Frankel et al. 2010).

### A3.9 SUPPLEMENTARY FIGURES

#### **Figure S1. *Myf5*, *MyoD* and *Myogenin* expression in *Pitx2* mutants.**

A-B)  $\beta$ -galactosidase staining of E11.0 forelimb buds from *Pitx2*<sup>+/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> and *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/+</sup> embryos. C, D) Wholemount in situ hybridization for *MyoD* in hindlimb buds of E12.5 *Pitx2*<sup>+/-</sup> and *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos. E, F) Wholemount in situ hybridization for *myogenin* in E13.0 forelimb buds of *Pitx2*<sup>+/-</sup> and *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos.

#### **Figure S2. Number and proliferation of limb myogenic progenitors is unaffected in *Pitx2* mutants.**

Limb myogenic progenitors revealed by Pax3 immunofluorescence (A, D, G, M) were co-stained for Ki67 (B, E), or  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) (H, N) to identify proliferating cells (C, F), and the number of Pax3/*Myf5* double positive precursors (I, O).

#### **Figure S3. *MyoD* core enhancer (CE) and proximal region (PR) contain three putative Pitx binding sites that bind Pitx2.**

(A) Sequence alignment of mouse and human core enhancer showing localization and conservation of PRE1 and PRE2. (B) Electrophoretic mobility shift assays using *in vitro* translated Pitx2 (lanes 1-9, 12 and 13) or Pax3 (lanes 10 and 11) and wild-type (wt) or mutant (mut) oligonucleotide probes for PRE1, PRE2, PRE1/2 or PRE3 as indicated. Positive control for Pax3 binding site (M, lane 11) is from Bajard et al (Bajard et al. 2006). Pitx2 and

Pax3 complexes with DNA are indicated by arrows and complexes supershifted by Pitx2 antibody are indicated by arrowhead. n.s.: non-specific. Electrophoretic mobility shift assays were performed as described by Bajard et al (Bajard et al. 2006).

**Figure S4. *MyoD* recovery occurs similarly in limbs of *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Pitx3<sup>-/-</sup>* and *Pitx2<sup>-/-</sup>* mutants.**

Dorsal views of forelimb buds from E13 *Pitx2<sup>+/-</sup>;**Pitx3<sup>+/-</sup>* (A), *Pitx2<sup>+/-</sup>;**Pitx3<sup>-/-</sup>* (B) and *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Pitx3<sup>-/-</sup>* (C) embryos stained by wholemount *in situ* hybridization for *myogenin* transcripts.

**Figure S5. Unaltered *Myf5* ( $\beta$ -galactosidase) expression in limbs of *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/nLacZ</sup>* mutants.**

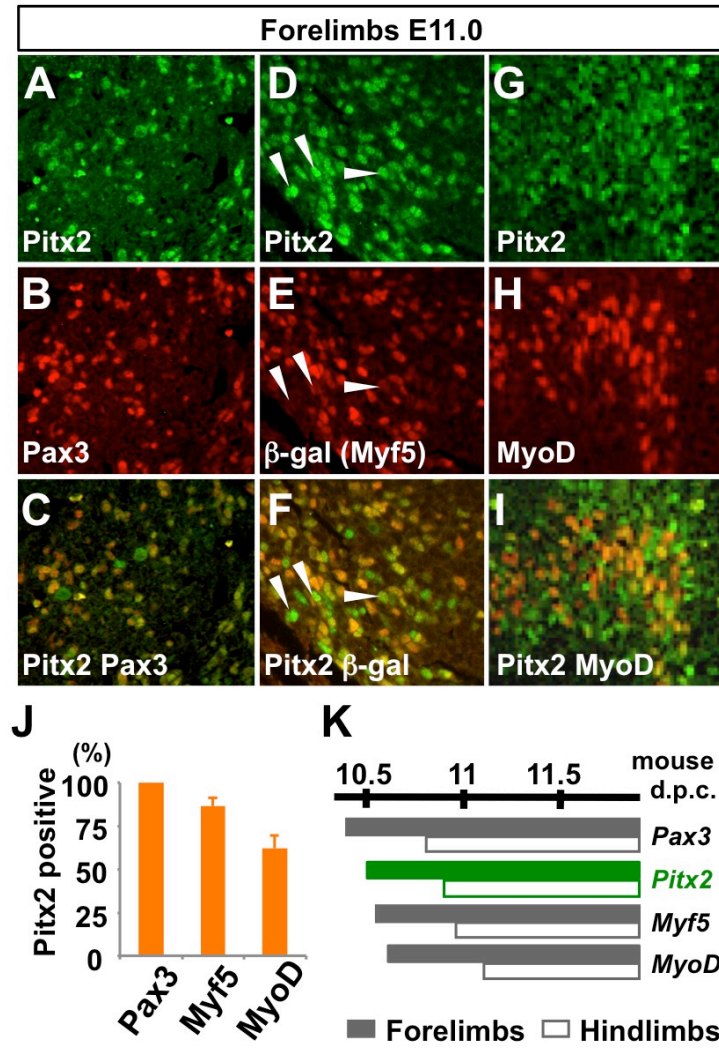
A-D)  $\beta$ -galactosidase staining of E11.5 embryos reveals unaltered  $\beta$ -galactosidase(*Myf5*) expression in *Pitx2/Myf5* double mutants.

**Figure S6. Impaired differentiation in hypaxial myotome in absence of *Pitx2* and *Myf5/Mrf4*.**

A-D) General view of E12.5 *Pitx2<sup>+/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (A), *Pitx2<sup>+/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/LacZ</sup>* (B), *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (C) and *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/LacZ</sup>* (D) embryos stained by wholemount *in situ* hybridization for *MyoD* transcripts. The asterisks point to the myotome showing normal expression and nearly complete rescue of *MyoD* respectively in *Pitx2<sup>-/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/+</sup>* (C) and *Pitx2<sup>+/-</sup>;**Myf5<sup>nLacZ/LacZ</sup>* (B), but



defective hypaxial *MyoD* expression in *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/LacZ</sup> (D). (E, F)  $\beta$ -galactosidase staining of E11.5 embryos reveals unaltered  $\beta$ -galactosidase(*Myf5*) expression in myotome of *Pitx2/Myf5* double mutants. (G, H) Hypaxial expression of myogenin is lost in *Pitx2*<sup>-/-</sup>;*Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> E11.5 thoracic myotome as revealed by immunofluorescence for myogenin.  $\beta$ -galactosidase (*Myf5*) staining reveals myogenic precursors.



**Figure A2.1** Limb expression of Pitx2 precedes Myf5 and MyoD.

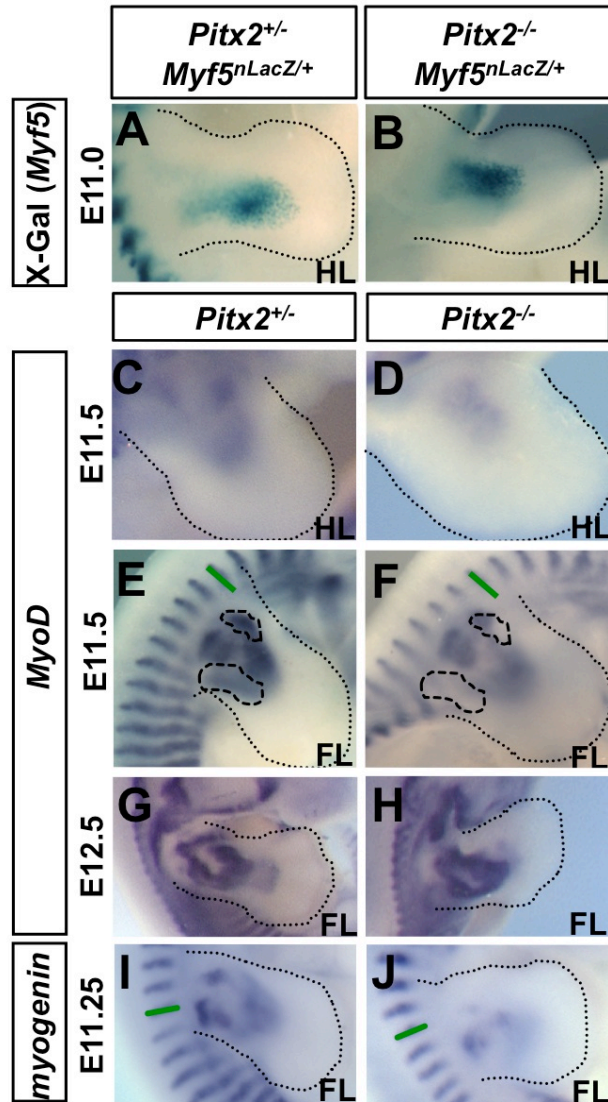


Figure A2.2 *MyoD* and *myogenin*, but not *Myf5*, expression are deficient in limbs of *Pitx2* mutant embryos.

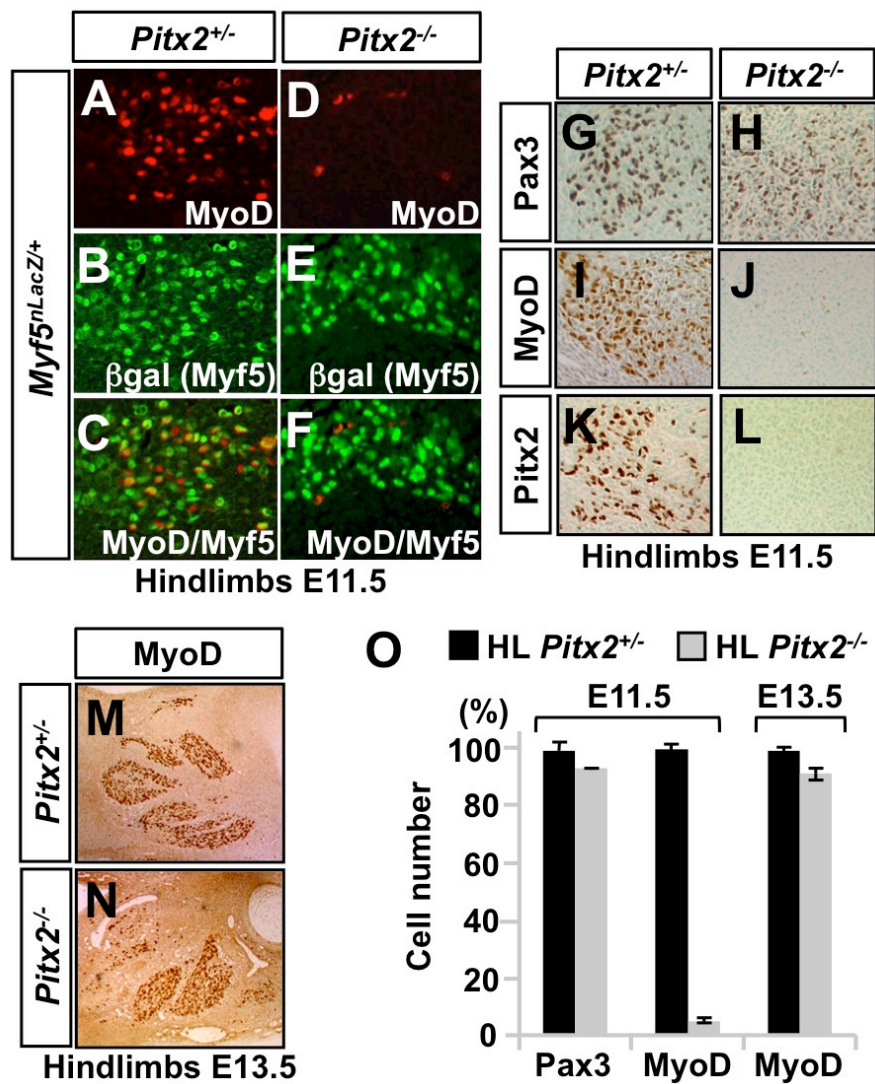
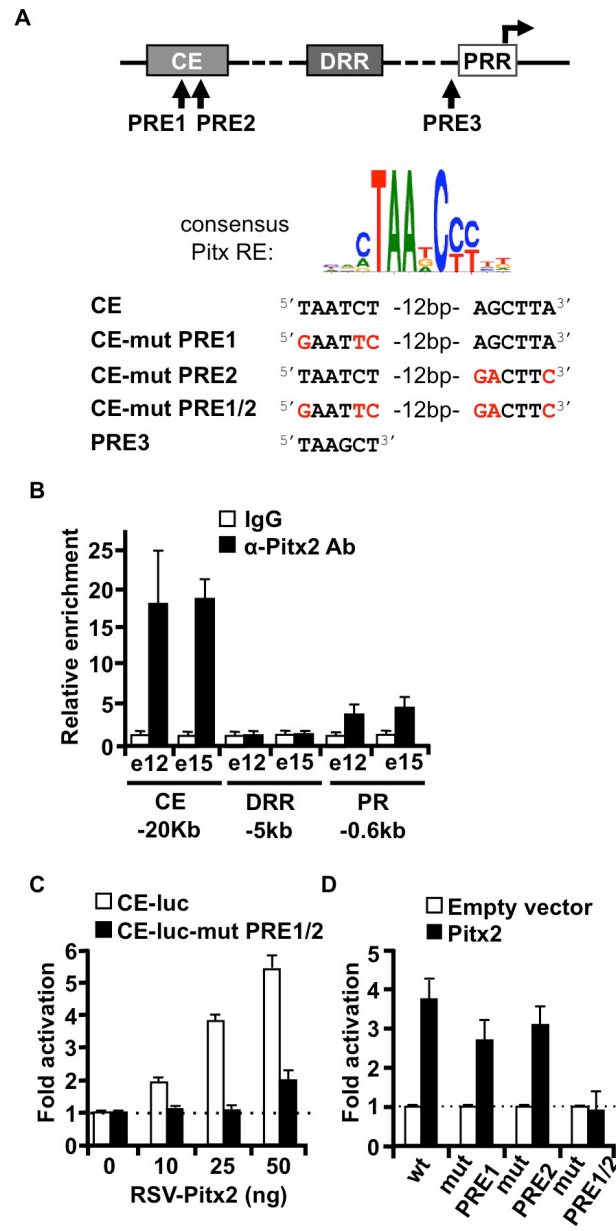


Figure A2.3 Limb MyoD deficiency is transient in *Pitx2*<sup>-/-</sup> embryos.



**Figure A2.4** Pitx2 directly regulates *MyoD* expression through binding of the core enhancer (CE).

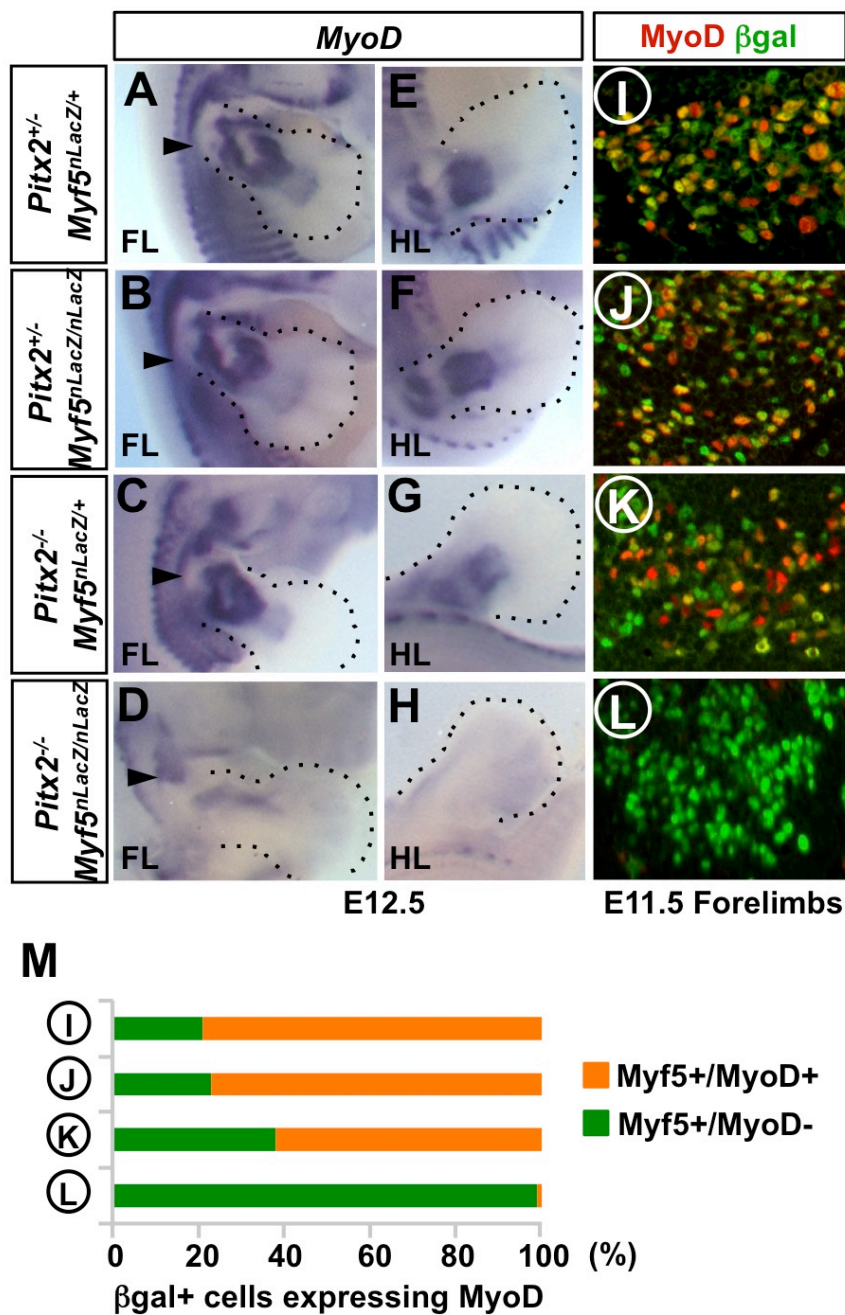


Figure A2.5 *Myf5* compensates functionally for *MyoD* expression in *Pitx2*<sup>-/-</sup> limbs.

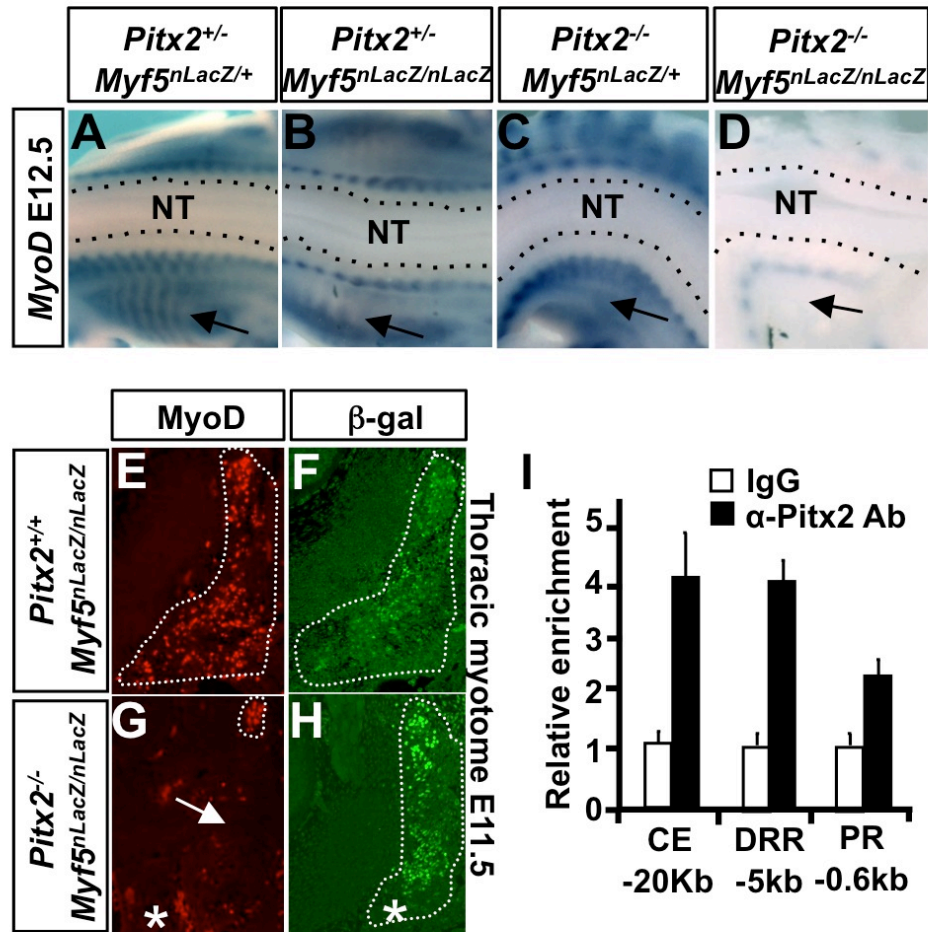


Figure A2.6 *Pitx2* is sufficient for hypaxial myotome expression of *MyoD* in absence of *Myf5* (*Mrf4*).

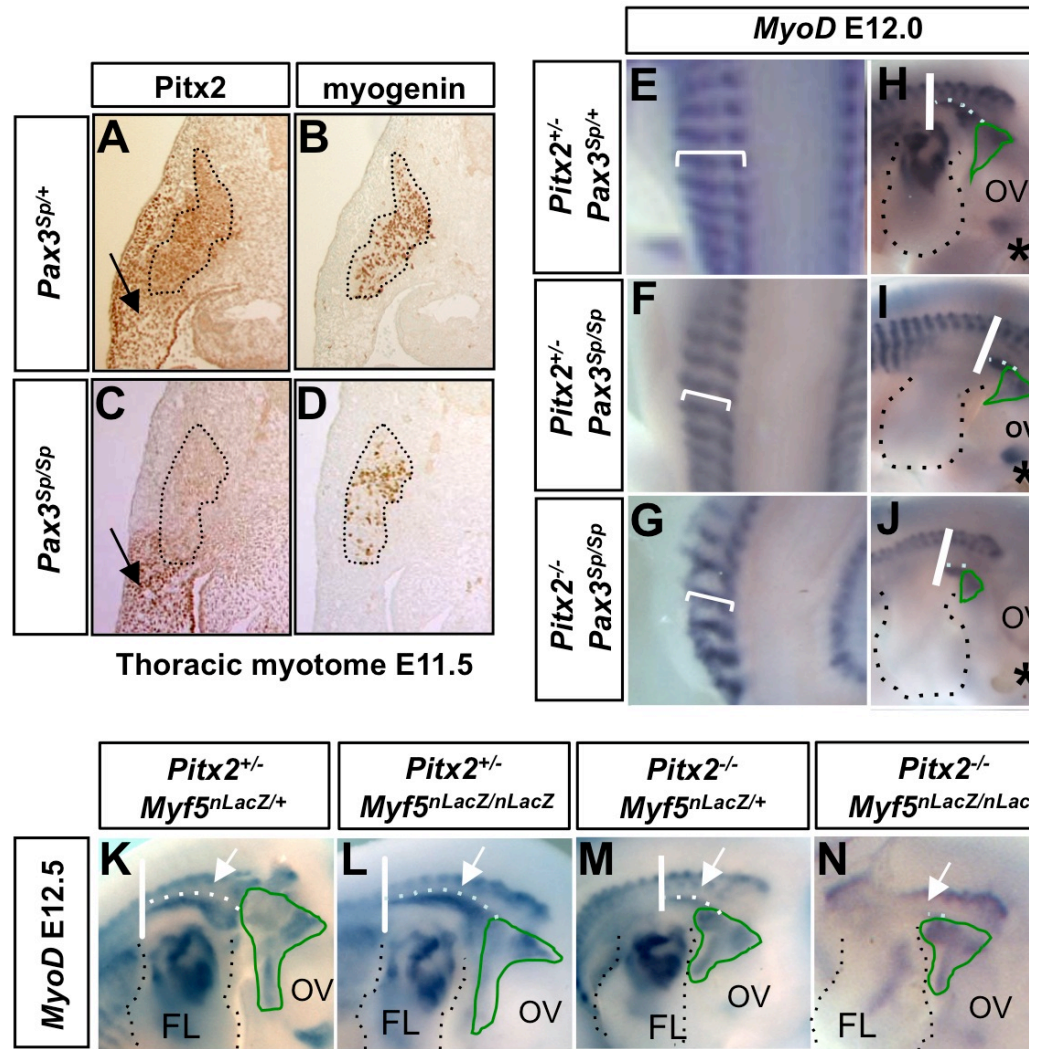


Figure A2.7 Cooperation between *Pax3/Pitx2* and *Myf5/Mrf4* pathways for *MyoD* expression in myotome and shoulder girdle muscle.



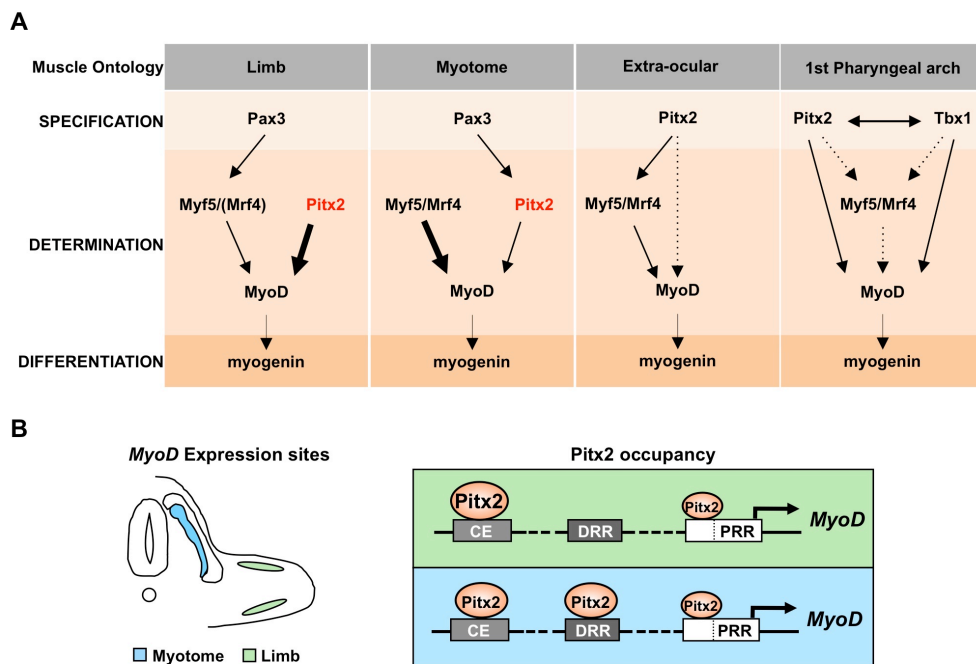


Figure A2.8 MyoD gene regulation.

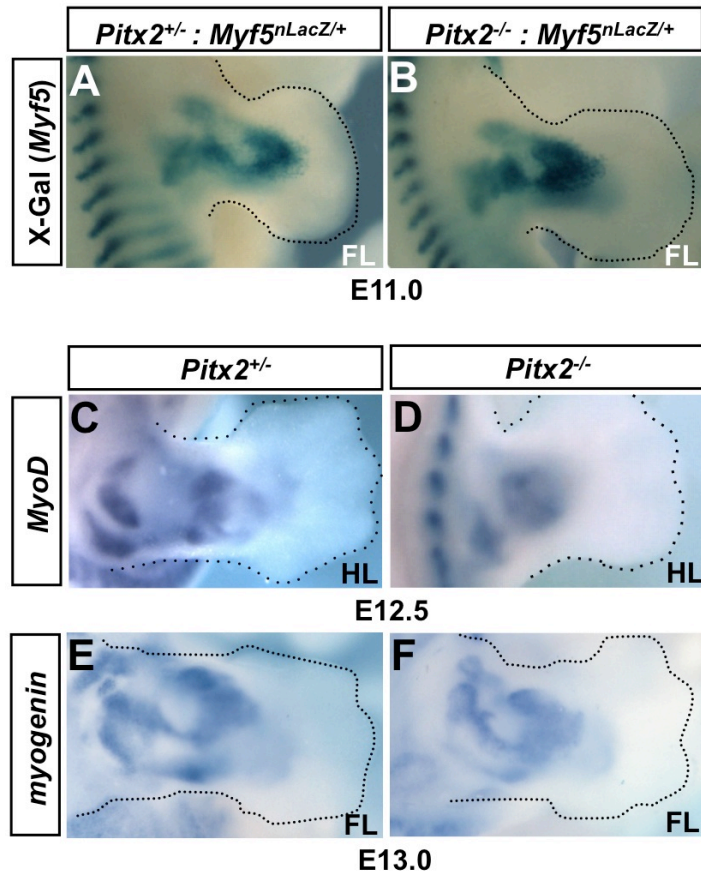
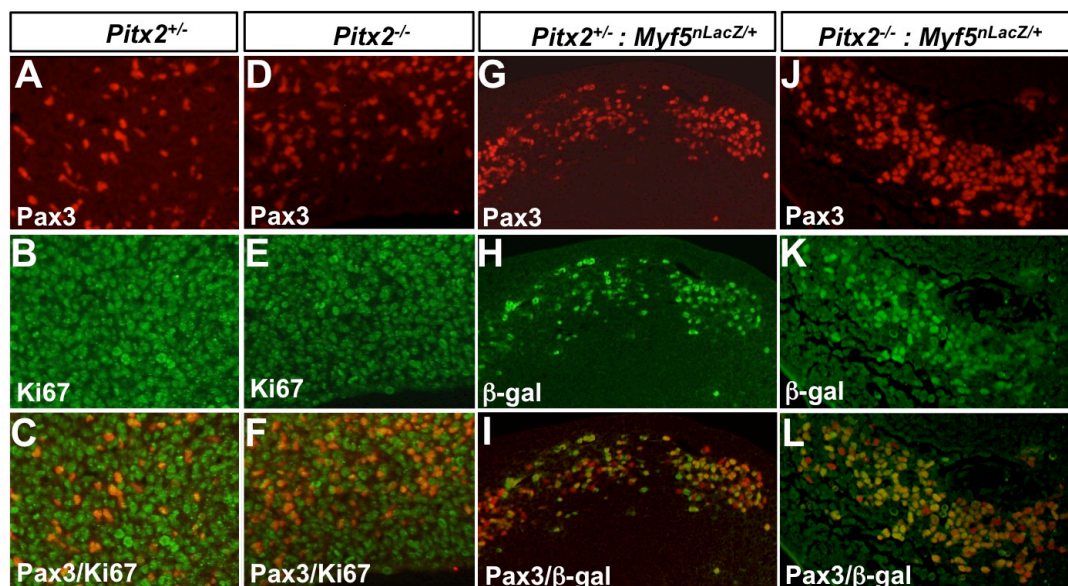


Figure A2.S1 *Myf5*, *MyoD* and *Myogenin* expression in *Pitx2* mutants.



**Figure A2.S2** Number and proliferation of limb myogenic progenitors is unaffected in *Pitx2* mutants.

**A**

```

mouse  CACAGCATTGCGGGGCATTTATGGGTCTTCTCTATAAACTTCTGAGACAGTAATTTTATCC
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
human  CACAGCAGCTGGGGGCATTTATGGGCCTTCTCTATAAACTTCTGAGAGGGTAAC TTTATCC

      PRE1
mouse  TGCTTCTTTTCGGCCAAGTATCCTCCTCCAGCAGCTGGTCACAAAGCCAGT TAATCTCCCA
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
human  TGCTTCTTTTCAGCCAAGTATCCTCCTCCAGCAGCTGGTCACAAAGCTGGT TAATCTCCCA

      PRE2
mouse  GAGTGCTCAGCTTAAAACCCGTGACTCACAAACACAGCCAGTTGGGGGAAGGGGACAGCCG
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
human  GAGTGCTCAGCTTAAAACCCGTGACTCACAGCACAGCCAGTGTGGGGGAGGGGGTGGCTG

mouse  CCTCCAA-ACGTGGCGCCAGAGTCAGCTGTTCTGGGTCTTCTCCGGTTTCTCTAGCTC
      |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
human  CCTCCAATACGTGGCGCCAGAGTCAGCTGTTCTGGGGCCTTCTCTGGTTTCTCCAAC T G
  
```

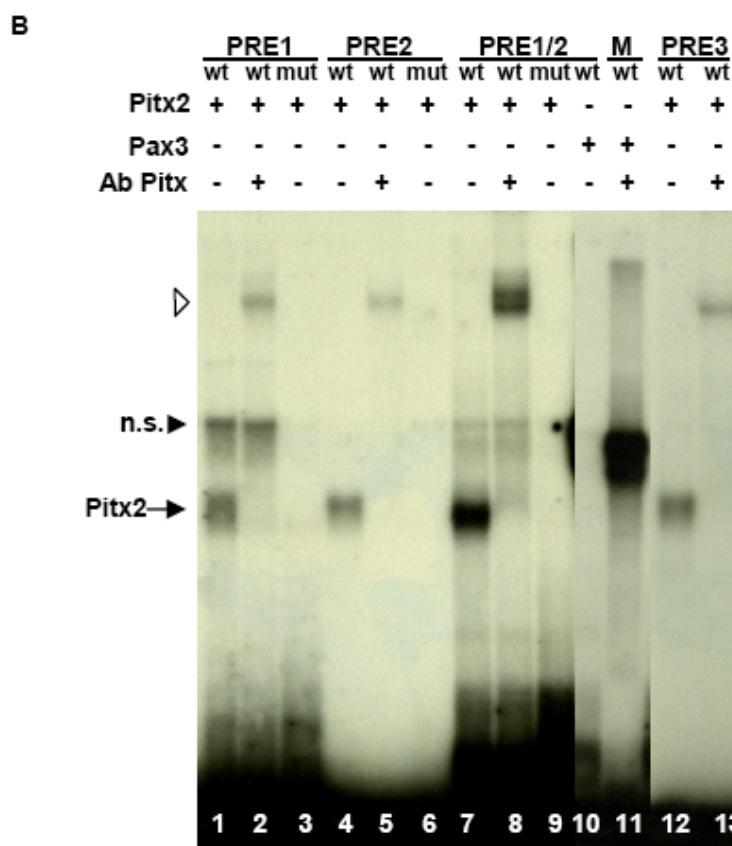


Figure A2.S3 *MyoD* core enhancer (CE) and proximal region (PR) contain three putative Pitx binding sites that bind Pitx2.

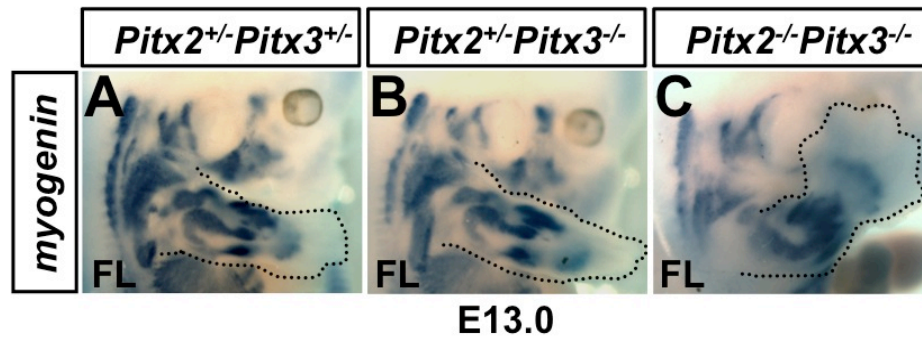


Figure A2.S4 *MyoD* recovery occurs similarly in limbs of *Pitx2*<sup>-/-</sup>:*Pitx3*<sup>-/-</sup> and *Pitx2*<sup>-/-</sup> mutants.

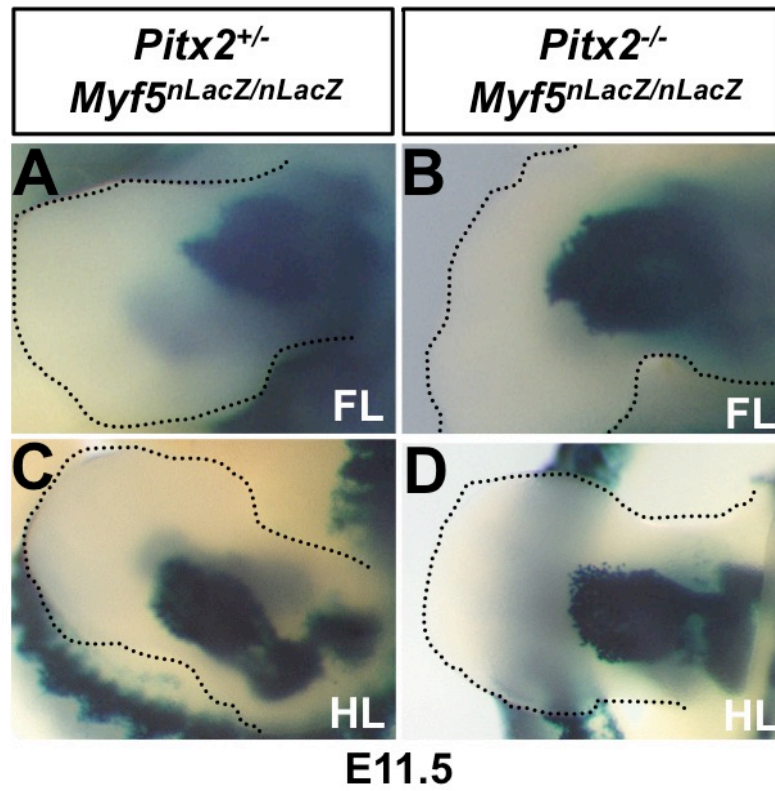
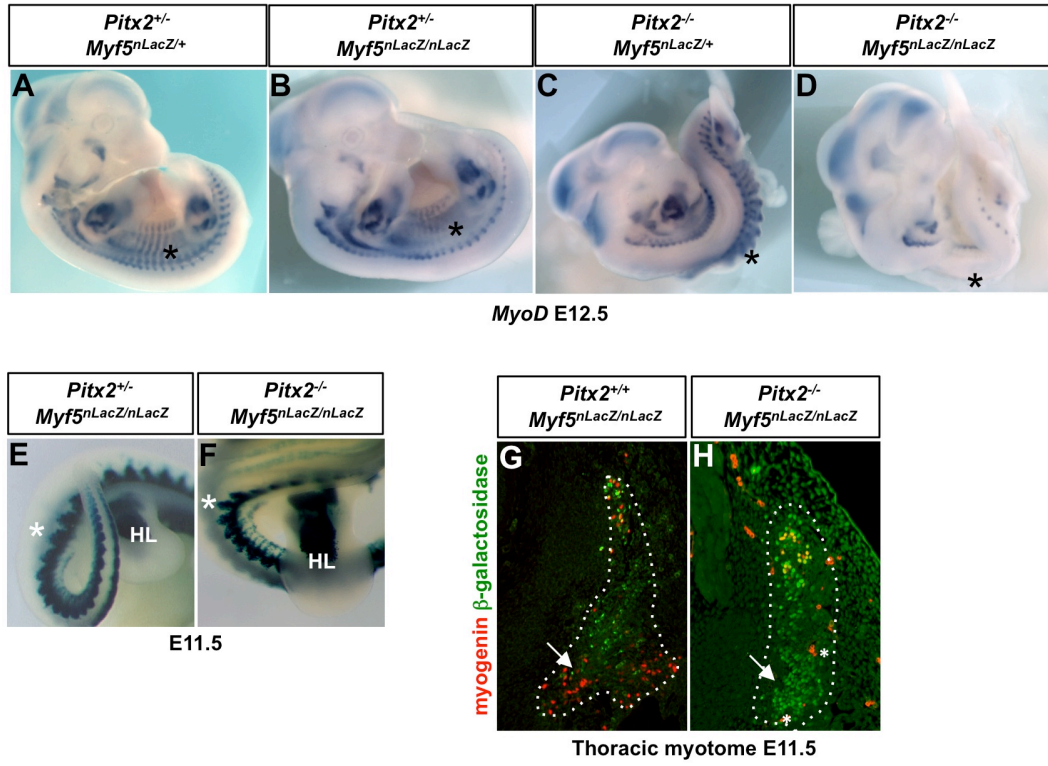


Figure A2.S5 Unaltered Myf5 ( $\beta$ -galactosidase) expression in limbs of *Pitx2*<sup>-/-</sup>; *Myf5*<sup>nLacZ/nLacZ</sup> mutants.



**Figure A2.S6 Impaired differentiation in hypaxial myotome in absence of *Pitx2* and *Myf5/Mrf4*.**

