

Université de Montréal

**Étude des mécanismes par lesquels l'acide rétinoïque
contrôle l'identité des segments le long de l'axe
antéropostérieur**

Cdx1 est une cible directe des récepteurs de l'acide rétinoïque

par

Martin Houle

Programme de Biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de docteur
en Biologie moléculaire

décembre 2003

© Martin Houle, 2003



Q4
506
U54
2004
v.014



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude des mécanismes par lesquels l'acide rétinoïque contrôle l'identité des segments le long de l'axe antéropostérieur

présentée par :
Martin Houle

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Vacher , président-rapporteur
David Lohnes, directeur de recherche
Dre Muriel Aubry, membre du jury
Dr Stefano Stifani, examinateur externe
[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES

Résumé

L'acide rétinoïque (RA) est essentiel au bon déroulement de plusieurs programmes développementaux. C'est pourquoi des animaux où les niveaux sont trop élevés ou trop bas présentent des malformations, dysplasies, ou agenèse de multiples organes et structures, incluant, les yeux, les reins, le cartilage, le cœur, le tractus urogénital, le tube neural, les membres, le squelette axial. Cette molécule sert de ligand aux facteurs de transcription inductibles que sont les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR). L'inactivation génique des RAR entraîne aussi des défauts du squelette axial dont les segments (vertèbres) sont sujets à adopter l'identité de segments situés à d'autres niveaux le long de l'axe antéropostérieur (AP). Ce genre de défaut se nomme transformation homéotique.

L'identité des segments le long de l'axe AP est attribuée selon quel sous-groupe de gènes *Hox* chacun exprime au cours du développement, c'est ce que l'on nomme le code *Hox*. De façon concordante, l'excès, ou la carence en RA modifie ce code et altère ainsi l'identité de ces segments. Des éléments de réponse pour les RAR ont été décrits pour plusieurs gènes *Hox*, expliquant leur sensibilité à RA. Cependant, ces RARE ne semblaient essentiels qu'au maintien de l'expression de ces *Hox* dans le tube neural et non dans le mésoderme paraxial qui donnera naissance aux vertèbres. L'une des explications à cet observation est que RA utilise un intermédiaire pour réguler l'expression de ces *Hox* dans le mésoderme paraxial.

Nous avons postulé que le gène *Cdx1*, déjà connu comme régulant l'expression de plusieurs *Hox* dans divers systèmes, est un candidat fort probable pour servir d'intermédiaire entre RA et *Hox* dans le mésoderme. Supportant ce modèle, l'inactivation génique de *Cdx1* cause des altérations d'identité vertébrale, décrite comme des transformations homéotiques accompagnées d'un décalage dans l'expression de certains gènes *Hox* dans le mésoderme.

Nous rapportons donc dans cette thèse la démonstration de la validité du postulat. Tout d'abord nous révélons la présence d'un RARE dans le promoteur de *Cdx1*, nécessaire à l'action de RA sur *Cdx1 in vitro*. Nous appuyons ces résultats par l'habilité des RAR et de son partenaire RXR à lier ce RARE *in vitro*, par la capacité de RA d'induire l'expression de *Cdx1* directement *in vivo* et par la diminution d'expression de *Cdx1* chez des mutants RAR.

Afin de confirmer le rôle essentiel du RARE pour la régulation de *Cdx1* et par conséquent pour la régulation des gènes *Hox* et de l'identité des vertèbres, nous avons réalisé la mutation ponctuelle de cet élément *in vivo*, dans le promoteur endogène de *Cdx1*. Les souris obtenues qui portent cette mutation présentent certaines transformations homéotiques observées chez les mutants *Cdx1* et ces mutations sont expliquées moléculairement par une diminution d'intensité d'expression de *Cdx1* et par le décalage postérieur de l'expression de certains *Hox*.

Ces études mettent donc en lumière un nouveau mécanisme par lequel RA peut contrôler l'expression des *Hox* dans le mésoderme et ainsi agir sur l'identité vertébrale.

Mots-clés : Acide rétinoïque, récepteur nucléaire, RA, RAR, RARE, Cdx, Caudal, *Hox*, axe antéropostérieur, somites, vertèbres, Wnt, FGF, homéobox, knockout.

Abstract

Retinoic Acid (RA) is essential for the proper ontogeny of the animal embryo by controlling various developmental programs. Consistent with this affirmation, animals presenting abnormally high levels of RA or animals deprived of it display numerous malformations, dysplasia, or agenesis of multiple organs and structures, including, the eyes, kidneys, various cartilages, heart, urogenital tract, neural tube, limbs, axial skeleton and more. RA is the natural ligand for inducible transcription factors: the Retinoic Acid Receptors (RAR). The targeted inactivation (knockout) of RARs also leads to axial skeleton malformations, where the segments (vertebrae) are susceptible to acquire the identity of a segment located elsewhere along the anteroposterior (AP) axis. This kind of malformation is referred to as homeotic transformation.

The identity of a segment along the AP axis is conferred by the subset of *Hox* genes it expresses during embryonic development; this is referred to as the *Hox* code. Accordingly, RA excess or RA deprivation modifies this code thus altering the identity of these segments. DNA sequences that can bind RAR (RARE) have been described for many *Hox* genes, offering an explanation for their RA sensitivity. However, these RAREs only seemed essential for proper *Hox* expression in the neural tube and not for their expression in the paraxial mesoderm which will give rise to the rib anlage. One of the possible explanations for this would be for RA to exert its effect on *Hox* expression in the paraxial mesoderm through an intermediate molecule.

We hypothesized that the gene *Cdx1*, previously shown to regulate multiple *Hox* genes in various systems, is a likely candidate to serve as an intermediary between RA and *Hox* in the mesoderm. In favor of this model, the knockout of *Cdx1* causes alterations to the vertebral identity, described as homeotic transformations, accompanied by a posterior shift in the expression of *Hox* genes in the mesoderm.

We here demonstrate the validity and the implications of our hypothesis with regards to vertebral patterning. We first describe the presence of a functional RARE in *Cdx1* promoter that is required for RA activation of this promoter *in vitro*. We also support these results by the demonstration that RAR and their partner RXR can bind to the described RARE *in vitro*, by the ability of RA to directly activate *Cdx1* transcription *in vivo* and by the reduction in *Cdx1* transcripts in RAR mutant mice.

To further confirm the RARE has a crucial role for the regulation of *Cdx1* transcription *in vivo*, hence that of hox genes and vertebral patterning, we did a punctual mutation of the RARE *in vivo* in the endogenous promoter of *Cdx1*. The mice bearing this mutation that we created displayed some of the malformations observed in *Cdx1* mutants and these homeotic transformations were rationalized at the molecular level by a reduction in the expression of *Cdx1* and by the consequential posterior shift in the expression of some *Hox* genes.

These studies helped unveil a novel mechanism by which RA can control *Hox* gene expression in the mesoderm and thus on vertebral patterning.

Keywords : Retinoic Acid, Nuclear Receptors, RA, RAR, RARE, Cdx, Caudal, *Hox*, anteroposterior axis, somites, vertebrae, Wnt, FGF, homeobox, knockout.

Table des Matières

Chapitre 1 : Introduction

1.0 Introduction	1
1. 1. Classification des récepteurs	1
1.1.1. Les récepteurs de l'acide rétinoïque	1
1.1.2. La structure des récepteurs nucléaires	4
1.1.3. La régulation transcriptionnelle par les RAR	8
1.1.3.1. L'action des RAR dépend de la dimérisation avec RXR	8
1.1.3.2. La compétition des RAR par d'autres récepteurs nucléaires.....	10
1.1.3.3. La dégradation des RAR.....	11
1.1.3.4. Les corépresseurs des récepteurs nucléaires	11
1.1.3.4.1 La boîte CoRNR	12
1.1.3.4.2 Les corépresseurs NCoR et SMRT	14
1.1.3.4.3 Les corépresseurs Sun-CoR, SURF3 et NURD	16
1.1.3.5. Les Coactivateurs des RAR	16
1.1.3.5.1. La boîte NR	17
1.1.3.5.2. Les activateurs de la famille SRC-1/p160	17
1.1.3.5.3. Les activateurs acétyltransférases PCAF/CBP/p300	18

1.1.3.5.4. Le complexe SWI/SNF/BRG1/BRM et le remodelage de la chromatine	20
1.1.3.5.5 Le complexe médiateur DRIP/TRAP	21
1.1.3.5.6. D'autres modulateurs positifs de la transactivation par les récepteurs nucléaires	21
1.1.4. Les ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque	22
1.1.4.1. Le métabolisme de l'acide rétinoïque	23
1.1.4.1.1. Apport et stockage de la vitamine A	23
1.1.4.1.2 Mobilisation des stocks de rétinol	23
1.1.4.1.3. L'acide rétinoïque dans la cellule du rétinol au rétinol	24
1.1.4.1.4. L'acide rétinoïque dans la cellule du rétinol à l'acide carboxylique	26
1.1.4.1.5. La protéine cellulaire de liaison à l'acide rétinoïque CRABP	26
1.1.4.1.6. Le catabolisme de l'acide rétinoïque et le rôle des cytochromes p450	27
1.1.4.2. La biodisponibilité de RA	28
1.1.4.2.1. Les techniques d'étude de biodisponibilité	28

1.1.4.2.2. La distribution d'acide rétinoïque chez l'embryon de souris	29
1.1.4.2.3. La distribution des gènes contrôlant les niveaux de RA chez l'embryon de poulet	31
1.1.4.2.4. La distribution des gènes contrôlant les niveaux de RA chez l'embryon de souris	32
1.1.5. Les études de carence en RA.	35
1.1.5.1. Les effets d'une carence alimentaire en RA : le syndrome VAD	36
1.1.5.2. Les effets de l'inactivation de l'enzyme RALDH2	37
1.1.5.3. Les effets de l'inactivation des récepteurs de l'acide rétinoïque	38
1.1.5.3.1. Récapitulation des défauts VAD chez les mutants RAR/RXR multiples	39
1.1.5.3.2. Défauts chez les mutants RAR/RXR non retrouvés chez les animaux VAD	39
1.1.5.3.3. Défauts chez les RAR dominants négatifs	43
1.1.5.3.4. Défauts chez des animaux traités avec un antagoniste des RAR	44
1.1.6. Les effets d'un excès de RA	44

1.1.6.1.1. L'exposition embryonnaire à RA cause des malformations squelettiques	45
1.1.6.1.2. L'exposition embryonnaire à RA cause des malformations du neurectoderme	46
1.1.6.2. La mutation des RAR entraîne une résistance au traitement avec RA	47
1.1.6.3.1. La mutation de CYP26 entraîne une surabondance de RA chez l'embryon	47
1.1.6.3.2. Le phénotype CYP26A1 ^{-/-} peut être corrigé en mutant RAR γ ou RALDH2	48
1.2.1. Les gènes à boîte Homéo	50
1.2.1.1. Les complexes BX-C /ANT-C et les transformations homéotiques	50
1.2.1.2. Le principe de colinéarité et le code <i>Hox</i>	53
1.2.1.3. La boîte homéo, structure et fonction	55
1.2.1.4. Les séquences cibles des protéines <i>Hox</i> /HOM-C et la séquence hexapeptide	55
1.2.1.5. MEIS, PBX et autres cofacteurs des HOX	56
1.2.2. Le patterning axial vertébral	58

1.2.2.1. Les vertèbres	58
1.2.2.2. Le tube neural et le rhombencéphale	59
1.2.3.1 Les gènes hox et le patterning AP	60
1.2.3.2. Le code <i>Hox</i> et l'établissement de l'identité vertébrale	62
1.2.3.3. L'expression des gènes <i>Hox</i> chez la souris	63
1.2.3.4. La régulation transcriptionnelle des gènes <i>Hox</i> par RA chez la souris	66
1.2.4.1. L'isolation du gène <i>Caudal</i>	68
1.2.4.2. Les complexes <i>protoHox/paraHox</i>	69
1.2.4.3. Les gènes <i>Cdx</i> et le patterning vertébral	69
1.2.4.4. L'expression des gènes <i>Cdx</i> chez la souris	70
1.2.4.4.1. L'expression de <i>Cdx1</i>	70
1.2.4.4.2. l'expression de <i>Cdx2</i>	71
1.2.4.4.3. l'expression de <i>Cdx4</i>	72
1.2.4.5.1. L'inactivation de <i>Cdx1</i> et le patterning AP	73
1.2.4.5.2. L'inactivation de <i>Cdx2</i> et le patterning AP	74
1.2.4.5.3. L'inactivation de <i>Cdx4</i> et le patterning AP	75

1.2.4.6. La régulation des <i>Hox</i> par CDX.....	76
2.4.7. La régulation transcriptionnelle par les CDX	77
1.2.4.8. La régulation croisée des <i>Cdx</i> entres-eux	80
1.2.4.9. La régulation des <i>Hox</i> par RA <i>Wnt</i> et FGF et <i>Cdx</i>	81
1.3. Hypothèse et mise en contexte	83
Chapitre 2	
2.0. Article 1 : <i>Cdx1</i> is a direct RA target gene : a novel pathway for retinoids and vertebral patterning	85
2.1. Avant-propos	85
2.2. Manuscrit	86
Chapitre 3	
3.0. Article 2 : Retinoic acid regulates a subset of <i>Cdx1</i> function <i>in vivo</i>	115
3.1. Avant-propos	115
3.2. Manuscrit	116

Chapitre 4	
4.0. Conclusion	163
4.1. <i>Cdx1</i> et la spécification vertébrale	163
4.1.1. Les malformations du knockout de <i>Cdx1</i>	164
4.1.2. La redondance fonctionnelle des membres <i>Cdx</i>	164
4.2. Les <i>Hox</i> chez les souris avec une activité CDX modifiée	166
4.3. À propos des <i>Hox</i> , du patterning vertébral et de la signalisation par RA et <i>Cdx</i>	167
4.3.1. L'identification d'un RARE dans le promoteur de <i>Cdx</i>	167
4.3.2. L'interaction génétique entre RAR γ et <i>Cdx1</i>	169
4.3.3. L'inactivation du RARE de <i>Cdx1</i> endogène	170
4.4. Le rôle de <i>Wnt</i> dans la régulation transcriptionnelle de <i>Cdx1</i>	173
4.4.1. Les sites LRE et la synergie <i>in vitro</i> de RA et <i>Wnt</i>	174
4.4.2. Les rôles et conséquences de l'autorégulation de <i>Cdx1</i>	175

4.4.3. Le rôle de FGF dans la régulation de <i>Cdx</i>	179
4.5. Conclusions et perspectives	179
4.5.1. Le modèle	179
4.5.2. Perspectives	181
5.0. Bibliographie	186

Liste des abréviations

AAA	Arche Antérieur de l'Atlas
Abd-(a/b)	Abdominal
AD	Domaine d'activation
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
AF	Fonction activatrice
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
AMP	Adénosine monophosphate
AP	Antéropostérieur
AR	Récepteur des androgènes
ARAT	Acétyl coenzyme A : Rétinol acétyltransférase
Bmi	Région d'insertion de Mo-MLV des lymphomes B
BMP	Protéine morphogénique des os
Cad	Caudal
CDRE	Élément de réponse à CDX
CBP	Protéine de liaison à CREB
CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse de l'AMP cyclique
COUP-TF	Facteur de transcription du promoteur en amont du gène de l'albumine du poulet
CRABP	Protéine de liaison à l'acide rétinoïque cytoplasmique
CRBP	Protéine de liaison au rétinol cytoplasmique
CTE	Extension carboxy-terminale
CYP26 (A1, B1, C1)	Cytochrome P450, membre 26

DBD	Domaine de liaison à l'ADN
Dfd	Deformed
DR	Répétition directe
DRIP	protéine d'interaction avec le récepteur de la vitamine D3
E	Jour embryonnaire
ER	Récepteur des Oestrogènes
ESC	Extra sex combs
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR (1)	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
Ftz	Fushi Tarazu
FXR	Récepteur de l'acide farnésique
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
HAT	Histone acétyl-transférase
HNF (1 α ou 4)	Facteur nucléaire hépatique
HDAC	Histone déacétylase
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTH	Homothorax
Kb	Kilobase
Lab	Labial
LEF	Lymphoid enhancer factor
LBD	Domaine de liaison au ligand
LRAT	Lecithine : Rétinol acétyltransférase
LRE	Élément de réponse à LEF
MAPK	Kinase de la protéine d'activation mitogénique
MEIS	Site d'intégration d'un virus écotropique causant la leucémie myéloïde
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
NCoA	Coactivateur des récepteurs nucléaires

NCoR	Corépresseur des récepteurs nucléaires
NID	Domaine d'interaction avec le récepteur nucléaire
P/CAF	Facteur associé à CBP/P300
P/CIP	Facteur associé au cointégrateur CBP/P300
PBX	Polycombes/trithorax
PLZF	Facteur leucémique promyélocytaire à doigts de zinc
PPAR	Récepteur des protéines prolifératrices activées des peroxisomes
PR	Récepteur de la progestérone
RA	Acide rétinoïque
RALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RXR	Récepteur du rétinoïde X
RARE	Élément de réponse des RAR
SRC-1	Coactivateur des récepteurs stéroïdiens
SMRT	Médiateur qui atténue les récepteurs RAR et TR
TA	Tubercule antérieur
TAF	Facteurs associés à la boîte TATA
TBP	Facteurs associés aux TAF
TCF	Facteur des cellules T
TR	Récepteur de l'hormone thyroïdienne
TRAP	Protéine associée au récepteur de l'hormone thyroïdienne
TSA	Trichostatine A
Ubx	Ultrabithorax
VAD	(syndrome de) déficience en vitamine A
VDR	Récepteur de la vitamine D3
Wnt	Similaire à Wingless
Zen	Zerknüllt

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Liste des défauts des mutants RAR retrouvés chez les VAD	40
Tableau 1.2. Liste des défauts des mutants RAR non-retrouvés chez les VAD	41
Tableau 3.1. Phénotype vertébral des différents mutants <i>Cdx1</i> , RARE et RAR γ	135
Tableau 3.2. Comparaison des niveaux de certains <i>Hox</i> dans des souches type sauvage, <i>Cdx1</i> ^{-/-} et RARE ^{-/-}	142
Tableau 3.3. Comparaison du phénotype vertébral chez les différents mutants, <i>Cdx1</i> , RARE, <i>Hoxa3</i> , <i>b3</i> , <i>d3</i> , <i>a4</i> , <i>b4</i> et <i>c4</i>	142

Liste des figures

Figure 1.1. Structure modulaire et classification des récepteurs nucléaires.....	3
Figure 1.2. Structure des récepteurs de l'acide rétinoïque.....	6
Figure 1.3. Mécanismes de répression et d'activation transcriptionnelle d'un gène cible par RXR/RAR	13
Figure 2.2. Expression de <i>Cdx1</i> chez les mutants RAR.....	97
Figure 2.3. Induction de <i>Cdx1</i> par RA en présence de cycloheximide <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	99
Figure 2.4. Isolement/caractérisation d'un RARE dans le promoteur de <i>Cdx1</i> par essais de transfections et de retards sur gel.....	102
Figure 3.1. Mutation du RARE de <i>Cdx1</i> par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires.....	125
Figure 3.2. Effet de la mutation du RARE sur la capacité du promoteur proximal à être induit par RA dans des essais de transfetctions.....	127
Figure 3.3. Expression de <i>Cdx1</i> chez des souris de type sauvage et RARE muté, au cours du développement.....	129
Figure 3.4. Expression de <i>Cdx1</i> chez des souris traitées ou non avec RA, de type sauvage et RARE muté, au cours du développement.....	130

Figure 3.5. Expression de <i>Cdx1</i> chez les RARE mutants traité ou non avec RA et en absence ou en présence de cycloheximide.....	132
Figure 3.6 Phénotype vertébral des souris mutantes pour le RARE et <i>Cdx1</i>	134
Figure 3.7. Phénotype vertébral des souris mutantes pour le RARE et RAR γ	137
Figure 3.8. Expression de <i>Hoxa3</i> , <i>b3</i> et <i>d3</i> chez des souris de type sauvage, <i>Cdx1</i> muté ou RARE muté	140
Figure 3.9. Expression de <i>Hoxa4</i> , <i>b4</i> et <i>d4</i> chez des souris de type sauvage, <i>Cdx1</i> muté ou RARE muté.....	141
Figure 4.1. Régulation du promoteur de <i>Cdx1</i> par RA, Wnt et CDX1	177
Figure 4.2. Modèle résumant certains facteurs qui influencent l'expression des <i>Hox</i> dans le mésoderme et le tube neural	182

À ma famille...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tout le jury d'examen pour le temps investi à la lecture de ma thèse et aux suggestions apportées. Je me dois également de remercier les membres permanents de mon comité d'évaluation, les docteurs, Jean Vacher, Mark Featherstone et Ted Bradley. Mes remerciements à mon superviseur et directeur David Lohnes, qui a dirigé mes travaux d'une façon constructive pendant plus de six ans tout en me laissant la possibilité d'explorer de nouvelles avenues. Merci aussi de m'avoir transmis un regard critique et impartial sur mes expériences et celles d'autrui. Merci finalement d'avoir mis tant de soin à lire ma thèse afin de m'aider à en faire le manuscrit et le grimoire qu'elle méritait d'être. Merci aussi à tout le labo Lohnes, présent et passé dont la présence, le support et l'encouragement fut, pour moi comme pour eux j'espère, une motivation et une inspiration à persévérer même dans l'adversité. Merci donc, sans aucun ordre précis, à Debbie, Angelo, Marie-Claude, Philippe, Pascal, Sylwia, Mélanie, Takis, Suman, Leslie, Wei, Nathalie, Karen, Nicolas, CFC, Brigitte, Isabelle, Annie, Daphné, Pan et Joanne. (JRS est cité plus loin). Merci au Café Second Cup® qui, sans le savoir, fut l'hôte de multiples débats animés et de stimulations intellectuelles sans lesquelles mes travaux n'auraient pas été ce qu'ils furent. De même, merci au Pub Else's® dont la participation dans l'échafaudement de théories et dans la réalisation d'expériences fut critique, bien que généralement méconnue. Plusieurs professionnels de l'institut me furent d'une aide incalculable et pour n'en citer que certains : Christian, Hélène, Claudia, Qing Zhang, Michel, et Lise. Un gros merci à Jean-René, sans qui la tâche titaneste de croiser, génotyper, ségréguer et prendre soin des souris, ne serait pas encore accomplie et cette thèse loin d'être complète. Un autre merci va à Martin, qui, s'il perd sa fascination pour la mouche et la voie Ras, pourra toujours se recycler en psychologue pour étudiants gradués en biologie moléculaire... D'un point de vue plus personnel je tiens à remercier toute ma famille, mes amis et ma conjointe, Nathalie, pour leur support inestimable au long de mes études. Je vous en serai toujours reconnaissant.

L'homme est plus fort que ce qui le tue car il sait qu'il meurt et l'avantage que l'univers a sur lui, l'univers n'en sait rien.

Blaise Pascal

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Les récepteurs de l'acide rétinoïque

Les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) et les récepteurs X des rétinoïdes (RXR) font partie de la famille des récepteurs nucléaires. Nous retrouvons ces deux récepteurs des rétinoïdes au noyau, où ils sont associés à des séquences consensus d'ADN, sous forme d'hétérodimères. En absence d'acide rétinoïque (RA), le ligand naturel de RAR, ils sont associés à des corépresseurs qui répriment l'expression des gènes cibles de RA et dont les fonctions spécifiques seront détaillées plus loin. En présence de RA, le ligand lipophile auquel RAR s'associe dans le noyau, un changement conformationnel entraîne le remplacement des corépresseurs par des coactivateurs qui stimulent la transcription de ces mêmes gènes cibles. Ce sont donc des facteurs de transcription qui oscillent entre la fonction d'activateurs et de répresseurs selon leur état ligandé ou non.

1.1.1. Classification des récepteurs

Trois types de RAR sont codés par trois gènes différents, soit $RAR\alpha$, β et γ . Pour chacun de ces gènes existe plusieurs isoformes générés par des promoteurs alternatifs ainsi que par épissage différentiel. Il existe deux isoformes majeurs de $RAR\alpha$ (Leroy et al., 1991), quatre de $RAR\beta$ (Zelent et al., 1991) et deux de $RAR\gamma$ (Kastner et al., 1990). Les RXR, indépendamment de leur rôle de partenaire d'hétérodimérisation avec les RAR, peuvent aussi lier une certaine forme de RA (9-cis RA). Comme pour les RAR on en connaît trois membres, $RXR\alpha$, β et γ qui sont tous retrouvés sous deux isoformes (Mangelsdorf and Evans, 1995; Mangelsdorf et al., 1992). Les RAR et les RXR font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette famille comporte plusieurs sous-catégories (voir figure 1.1). La classe I des récepteurs nucléaires est constituée des récepteurs stéroïdiens, dont les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR), de la progestérone (PR), des androgènes (AR) et des œstrogènes (ER). Certains sont présents dans le cytoplasme ou parfois dans le noyau sous forme inactive associés à des protéines de choc thermique, les hsp (heat shock proteins). Suite à la liaison avec leur ligand correspondant,

les récepteurs de classe I sont transloqués au noyau (si nécessaire) et vont s'homodimériser sur des éléments de réponse palindromiques où chacun des partenaires de dimérisation lie une molécule de ligand. La seconde classe de récepteurs est constituée des récepteurs qui s'hétérodimérisent avec le récepteur RXR sur des éléments de réponse spécifiques. Dans cette situation, le partenaire RXR ne lie pas son ligand. Tous les récepteurs de cette seconde classe sont nucléaires et peuvent lier l'ADN même en absence de ligand où ils répriment activement leurs gènes cibles (Tsai and O'Malley, 1994). On y retrouve les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (TR), de l'acide rétinoïque (RAR), de la vitamine D (VDR) des proliférateurs des peroxisomes (PPAR) et de l'acide farnesoïque (FXR). Les classes III et IV regroupent les récepteurs orphelins (dont le ligand nous est inconnu) et qui lient l'ADN sous forme d'homodimères (classe III) (parfois d'hétérodimère avec RXR) ou de monomères (classe IV), respectivement. Dans le groupe III notons la présence de RXR, Coup-TF (I et II) et de HNF4 et dans le groupe IV de Ftz-F1, NGF-1B/Nurr77 et ERR1 et 2 (revue par : (Mangelsdorf et al., 1995; Mangelsdorf and Evans, 1995; Kastner et al., 1995; Perlmann and Evans, 1997; Green et al., 1992).

Cette classification des récepteurs nucléaires tient également compte du type de séquence nucléotidique consensus qu'ils reconnaissent. Presque tous les sites consensus connus pour les récepteurs nucléaires sont formés d'éléments constitués de six paires de bases. On fait généralement référence à ces éléments de réponse en fonction des récepteurs qu'ils reconnaissent; ainsi les éléments liant RAR sont des RARE, à TR des TRE etc...). Bien que plusieurs exceptions soient connues, de façon générale, les hexamères de type AGAACA sont préférentiellement reconnus par les GR, MR, PR et AR alors que les ER, TR, VDR et RAR préfèrent soient PuGG/TTCA où Pu est une purine (Glass, 1994). Ainsi, la première classe de récepteur se liera comme homodimère sur un double hexamère arrangé de façon palindromique inversée. Les membres de la seconde classe, dont les RAR font partie, lieront des doubles hexamères placés l'un à la suite de l'autre (direct repeats; DR) et qui sont séparés par un espacement variant de une à cinq paires de bases (DR1 à DR5). Initialement, il fut noté que VDR, TR et RAR liaient, de façon préférentielle, des

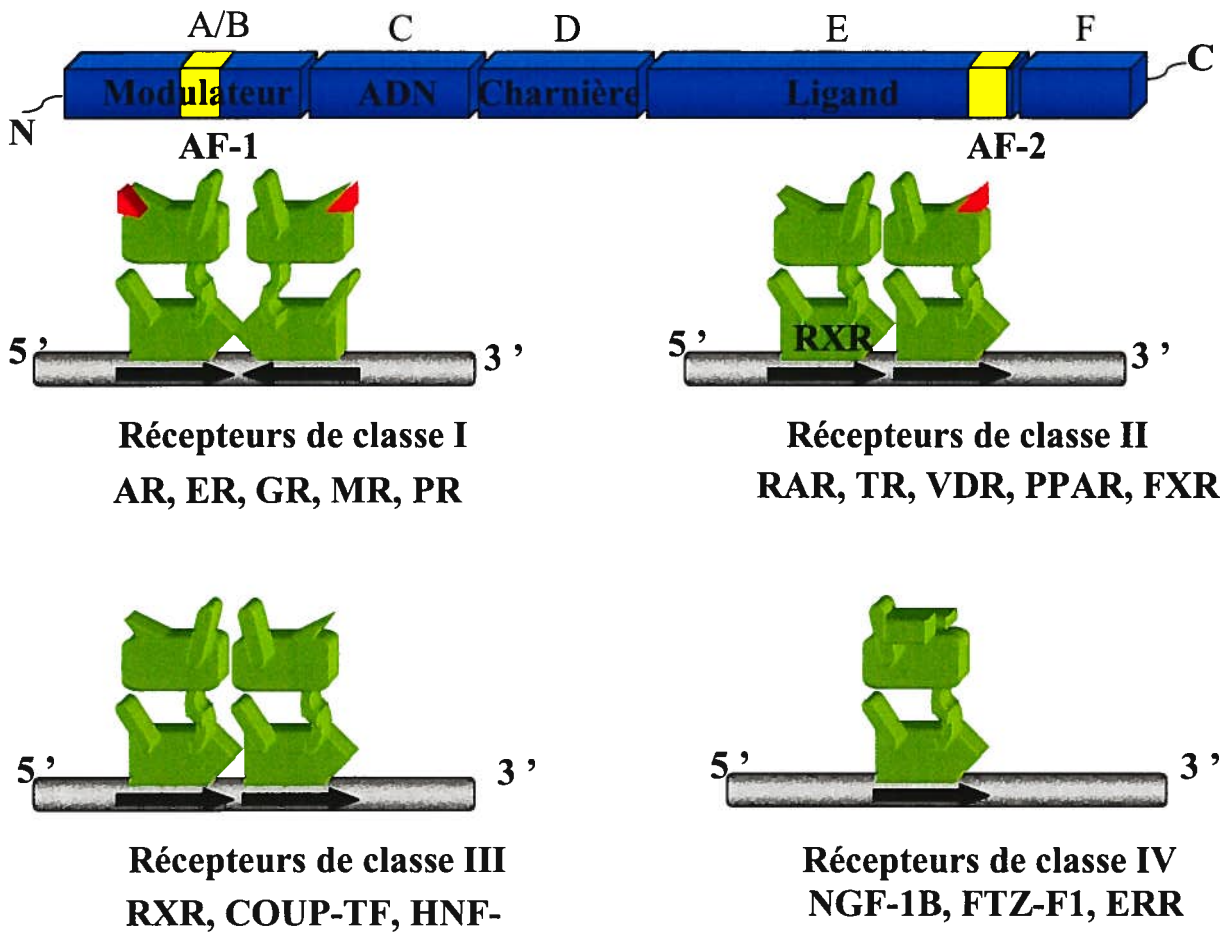


Figure 1.1. Structure des récepteurs nucléaires (haut) et schéma des quatre classes de récepteurs nucléaires (bas) illustrés interagissant avec l'ADN. Notons la structure modulaire des récepteurs. Spécifions que l'homodimérisation des récepteurs de classe I s'effectue principalement sur des sites palindromiques inversés ou chaque membre du dimère est lié à un ligand; que les hétérodimères des récepteurs de la classe II se font toujours avec RXR (non lié par son ligand) principalement sur des éléments DR2 ou DR5, que les ligands des récepteurs orphelins de la classe III sont inconnus mais lieraient possiblement deux molécules de ligand comme c'est le cas pour RXR avec 9-cis RA et finalement que les récepteurs orphelins de la classe IV n'ont pas de ligand connu et interagiraient avec l'ADN sous forme de monomères. Les triangles oranges représentent les ligands.

DR-3, 4 et 5 respectivement. Il fut ensuite observé que RAR reconnaissait aussi les DR2 et PPAR des DR1, menant donc à la règle de 1 à 5 régissant la spécificité des récepteurs de classe II. Les membres de la troisième classe lieront aussi des éléments de type DR alors que, bien évidemment, les monomères de la dernière classe n'occuperont que des séquences hexamères simples (Glass, 1994). Il est important de noter qu'un très grand nombre d'exemples échappent à cette règle. Des éléments en répétition face à face ou dos à dos, des DR0, des DR8 et plusieurs autres ont été décrits. Certains éléments palindromiques inversés ont été démontrés comme étant liés par TR, RAR et Coup-TF, lesquels, selon le consensus prédéfini, auraient préféré les éléments de type DR (Houle et al., 2000; Umesono et al., 1988). De plus, plusieurs exemples démontrent que certains éléments peuvent répondre à plus d'un type de récepteur récepteurs dont VDR, ER, TR, Coup-TF et RAR (Glass et al., 1988; Cao et al., 1996; Lee et al., 1995).

1.1.2. La structure des récepteurs nucléaires

Tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires ont une structure modulaire très bien conservée. Le domaine A/B, également appelé domaine modulateur, situé à l'extrémité N-terminale des récepteurs, est d'une longueur très variable entre les différents récepteurs (Giguere, 1994). Le domaine A/B contient un domaine de transactivation AF1 (Activation Function I) non dépendant de la liaison au ligand. Le domaine A/B est généralement plus étendu chez les membres de la classe I (principalement les récepteurs stéroïdiens), alors que chez les récepteurs nucléaires de la classe II, il est considérablement raccourci. L'activation de la transcription par le domaine AF1 est amplifiée de façon synergistique par le domaine AF2 lorsque ce dernier fixe son ligand (Chambon, 1996). Le domaine AF1 fut initialement soupçonné de jouer un rôle dans la reconnaissance de gènes cibles spécifiques (Tora et al., 1988; Umesono et al., 1988) pour ER mais ces résultats n'ont jamais été confirmés par la suite pour les RAR. De plus, les mutants RAR suggèrent une redondance fonctionnelle de ces récepteurs entre-eux (en conséquence ils peuvent reconnaître les mêmes cibles). Finalement, il a été récemment montré que des sérines de

cette région sont également, dans certains cas, phosphorylées par les MAP kinases. P38 phosphoryle le domaine AFI de PPAR α (Barger et al., 2001), de RAR α (Gianni et al., 2002) et de ER α (Kato et al., 2000). La fonction de cette phosphorylation demeure toujours nébuleuse mais il a été avancé qu'elle aurait pour fonction de favoriser le renouvellement (turnover) des récepteurs, via SUG-1 qui les dirige aux protéosomes. Cette fonction est plus couramment associée à la région AF-2 du domaine E (voir plus loin).

Le domaine C des récepteurs nucléaires contient le domaine de liaison à l'ADN et joue aussi un rôle dans la dimérisation des récepteurs. On retrouve dans le domaine C cinq régions ayant des fonctions complémentaires. Deux structures à doigts de zinc de type II, où un atome de zinc est coordonné à quatre cystéines, des boîtes P impliquées dans la reconnaissance des séquences hexamères et des boîtes D requises pour la dimérisation de ces récepteurs ont été définies (Umesono and Evans, 1989; Perlmann et al., 1993; Zechel et al., 1994). Une extension carboxy terminale (CTE) a aussi été décrite comme jouant un double rôle soit dans la liaison à l'ADN et la dimérisation des récepteurs, (Giguere, 1999).

Le premier doigt de zinc est orienté par un feuillet β et est adjacent à une structure en hélice α qui s'insère dans le sillon majeur de l'ADN, le tout permettant un bon contact entre certains résidus aminés et les phosphates de l'ADN ainsi que le contact de la boîte P avec les déoxynucléotides de l'ADN. Le second doigt de zinc ainsi que l'hélice α qui le suit, sont davantage requis pour la dimérisation avec le domaine C d'un partenaire de dimérisation via sa boîte D. Le domaine C de RXR est un peu différent en ce qu'il possède une troisième hélice α située immédiatement après le second doigt de zinc. Cette dernière aurait pour rôle de permettre l'hétérodimérisation avec les autres récepteurs de classe II (Lee et al., 1993) (voir figure 1.2.).

Le domaine D des récepteurs nucléaires est la région charnière (hinge). Cette région est hautement variable entre les types de récepteurs tant dans sa longueur que dans sa séquence primaire. Comme son nom l'indique, elle sert de charnière et permet non seulement de

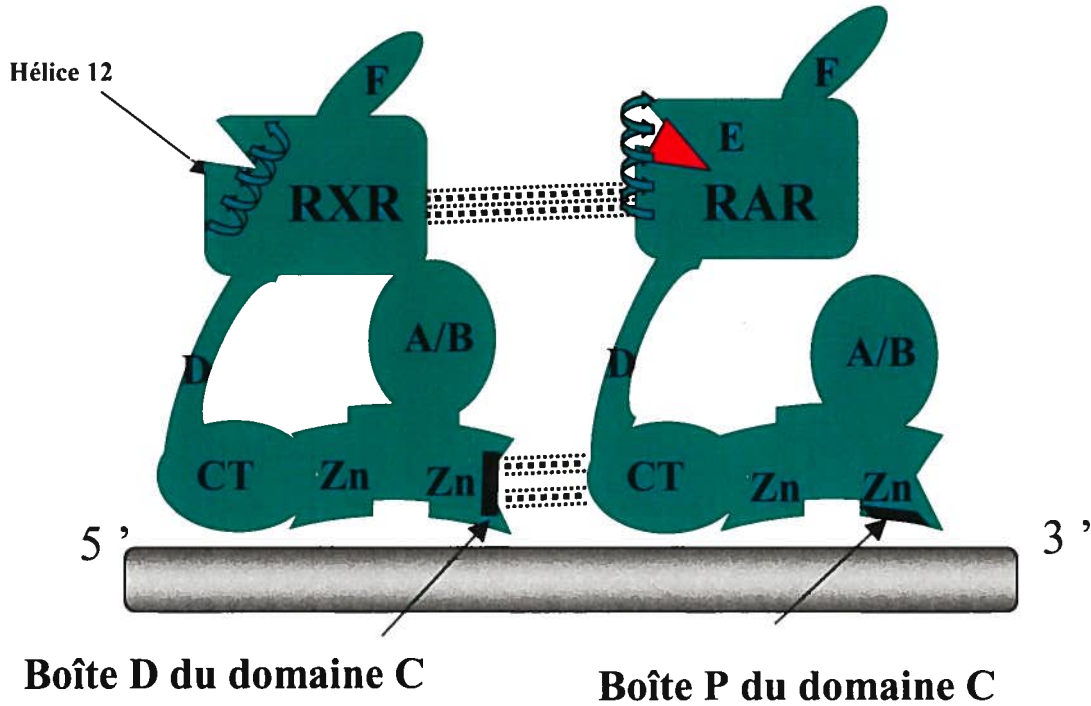


Figure 1.2. La structure des récepteurs de l'acide rétinoïque. Notons les six domaines, de A à F. Le domaine C, de liaison à l'ADN est lui-même composé de deux doigts de zinc (Zn) ainsi qu'une boîte D, permettant la dimérisation avec la région carboxy terminale (CT) du domaine C de RAR et une boîte P interagissant fortement avec l'ADN. Ajoutons que des interactions d'hétérodimérisation sont aussi fournies par les domaines de liaison du ligand de RXR et RAR et que seul RAR fixe son ligand. Finalement l'hélice hydrophobique (hélice 12) du domaine de liaison du ligand est aussi représentée vu son importance dans la fermeture de la poche hydrophobique du domaine E qui reçoit le ligand et qui l'emprisonne comme dans une souricière. Les motifs pointillés représentent les forces d'interactions entre les récepteurs.

relier le domaine de liaison à l'ADN du récepteur au domaine de liaison au ligand mais leur offre une meilleure liberté de mouvement l'un par rapport à l'autre. Comme les deux récepteurs impliqués dans le dimère reconnaissent soit une répétition directionnelle de la séquence hexamère consensus (DR1-5) ou un élément palindromique inversé ou opposé, il est admis que la région charnière permet un certain niveau de rotation du domaine de liaison à l'ADN si nécessaire, de façon à maximiser le contact entre les boîtes D et le CTE des domaines C des deux récepteurs (Tsai and O'Malley, 1994). Finalement, le domaine D est aussi impliqué dans l'arrimage de corépresseurs (Freedman, 1999; Chen and Evans, 1995b; Berghagen et al., 2002; Miyamoto et al., 2001).

Le domaine E, ou de liaison au ligand, est aussi multifonctionnel. Il sert d'interface de dimérisation (Ribeiro et al., 2001), de domaine de liaison au ligand (Chambon, 1996; Brzozowski et al., 1997), de site de liaison aux hsp chez les récepteurs stéroïdiens (Cadepond et al., 1991), de signal d'import nucléaire et d'un second domaine d'activation (AF 2) qui est dépendent de la liaison par le ligand (Tsai and O'Malley, 1994). La cristallisation de ce domaine chez les différents récepteurs nucléaires démontre qu'il a une structure conservée de 11 à 13 hélices α arrangées en trois couches qui enfouissent la région d'interaction avec le ligand au cœur du domaine de liaison au ligand. La liaison du ligand sur le domaine E entraîne un changement conformationnel entre-autres de la région C-terminale du domaine de E. Plus spécifiquement, c'est l'hélice 12, au cœur de la région AF-2 du domaine E qui scelle la poche hydrophobique, formée des hélices 3, 4, 5 et qui renferme le ligand, l'emprisonnant comme dans une souricière (Blondel et al., 1999). Ce repositionnement de l'hélice amphipathique du domaine AF-2 permet l'association avec des coactivateurs (Bourguet et al., 2000; Brzozowski et al., 1997; Renaud et al., 1995).

Finalement, la région variable F, trouvée en C terminal de la majorité des récepteurs nucléaires n'a pas de fonction typique documentée. Ainsi la délétion du domaine F du

récepteur aux œstrogènes (ER) fut originalement rapportée comme ne modifiant pas sa fonction (Kumar et al., 1987). Pourtant, cas par cas, différents exemples de fonctions pour le domaine F apparaissent, comme l'interaction de Smad4 et du domaine F de HNF4 (Chou et al., 2003), ou la modulation de l'affinité de l'estradiol pour ER α avec un domaine F muté (Schwartz et al., 2002).

1.1.3. La régulation transcriptionnelle par les RAR

Dans les sections qui suivent nous verrons comment les RAR remplissent leur rôle de facteurs de transcription. Leurs différents mécanismes de régulation ainsi que les protéines qui s'y associent de façon coordonnée seront décrits et plusieurs facettes de la régulation de l'action des RAR seront présentées afin d'avoir un aperçu général de la complexité de ce mécanisme. Plus principalement nous verrons les cofacteurs qui sont échangés lors de la liaison du RAR par son ligand afin de le convertir de répresseur à activateur transcriptionnel.

1.1.3.1. L'action des RAR dépend de la dimérisation avec RXR

Les récepteurs nucléaires de type II dimérisent avec les RXR sur des séquences consensus de six nucléotides répétées deux fois et arrangées de différentes façons : une répétition directe avec de un à cinq espaces entre les deux, DR1-5 (direct repeats); une répétition de l'hexamère mais dos à dos avec quatre à six nucléotides d'intervalle, ER4-6 (everted repeats); une répétition palindromique sans espacement. Les préférences de chaque combinaison de récepteur nucléaire de type II pour les différents types d'élément sont revues par Glass (Glass, 1994). La liaison des RAR à l'ADN est grandement augmentée par sa dimérisation avec RXR (Kliwer et al., 1992b; Leid et al., 1992; Yu et al., 1991), confirmant donc la nécessité de ce dernier dans la signalisation des rétinoïdes.

Les premières évidences de l'importance de la dimérisation avec RXR furent de nature génétique. En effet, la complémentation de plusieurs défauts inhérents au syndrome VAD

(déficiency en vitamine A), observés chez les doubles mutants RAR et RAR/RXR, mais non retrouvés chez les simples mutants RAR et RXR, désignait aussi ce dimère comme effecteur le plus en aval de RA (Kastner et al., 1997). Un point plus spécifique qui ressortait de l'étude était l'importance cruciale de RXR α dans la signalisation de RA. En effet, la mutation de RXR α en combinaison avec la mutation d'un RAR entraînait des défauts VAD, ce qui n'est pas observé avec les autres types de RXR. Cependant comme les mutants RXR α ne récapitulent pas un mutant total RAR il est manifeste que la signalisation de RA peut utiliser les autres isoformes de RXR comme effecteurs.

Ces résultats furent confirmés par des études *in vitro*, où plusieurs lignées de carcinomes embryonnaires déficientes en RAR, RXR ou une combinaison des deux furent établies. L'expression d'un nombre de gènes cibles induits par RA fut étudiée chez les diverses lignées mutantes concluant que le dimère RAR/RXR était bien l'unité fonctionnelle de la signalisation par RA. De plus, bien qu'une redondance partielle soit observée, certaines combinaisons de RAR/RXR semblaient réguler davantage certains gènes cibles que d'autres. Ce dernier effet est peut-être dû à la diversité des éléments de réponse aux récepteurs de l'acide rétinoïque (RARE) retrouvés dans le promoteur de ces différents gènes cibles, mais est plus probablement simplement dû aux différents niveaux d'expression de chacun des isoformes (Chiba et al., 1997).

Notons finalement que plusieurs indications suggèrent que les homodimères RXR, dont on peut induire la formation par traitement avec 9-cis RA (Dong and Noy, 1998; Lehmann et al., 1992; Lu et al., 1997) ne sont pas impliqués dans la transduction des signaux de RA chez la souris. La présence des RXR ne prévient pas les mutants RAR multiples de récapituler tous les phénotypes VAD (Kastner et al., 1997; Kliewer et al., 1992a; Kliewer et al., 1992b; Lohnes et al., 1995) et leur ligand naturel, le 9-cis RA ne fut pas retrouvé chez l'embryon de souris par HPLC (Horton and Maden, 1995). Par contre, il faut spécifier que des études récentes ont démontré l'existence d'une autre molécule endogène, l'acide

docosahexaénoïque qui peut lier les RXR dans le cerveau de souris (de Urquiza et al., 2000).

1.1.3.2 . La compétition des RAR par d'autres récepteurs nucléaires

Les RAR ne sont pas les seuls partenaires d'interaction des RXR. Tous les récepteurs nucléaires de classe II l'utilisent. En effet, VDR, TR et même le récepteur orphelin COUP-TFI peut hétérodimériser avec RXR (Kliwer et al., 1992a; Kliwer et al., 1992b; Leid et al., 1992). On comprend donc qu'une population donnée de RXR desserve plusieurs récepteurs nucléaires susceptibles de compétitionner pour les RXR disponibles. Certains ont même avancé que ces RXR se retrouveraient en solution et même sur des RARE sous forme de tétramères inactifs qui pourraient être dissociés en présence d'un ligand (Dong and Noy, 1998; Lin et al., 1997; Kersten et al., 1997b). Aucune preuve n'a cependant démontré que la concentration de RXR serait limitante dans la cellule.

Un autre niveau de compétition se retrouve au niveau de la liaison de ces récepteurs sur des sites consensus. Les dimères RAR/RXR, comme précédemment mentionné, reconnaissent et lient des séquences hexamères PuG(G/T)TCA arrangées en DR2 ou DR5. La nature directionnelle de cet arrangement laisse entrevoir que les sites ne sont peut-être pas équivalents. En effet, pour être efficacement activé par RA, l'hétérodimère doit être constitué d'un RAR sur l'hexamère 3' alors que son partenaire RXR doit occuper la séquence 5', comme c'est le cas sur des RARE DR2 et DR5. Sur un élément DR1, cette polarité est inversée et la présence du ligand n'induit pas le relâchement du corepresseur N-CoR et ne peut par conséquent pas activer la transcription du gène en aval (Kurokawa et al., 1994; Kurokawa et al., 1995; Predki et al., 1994).

Malgré l'apparente conservation de ces éléments hexamères et de leur arrangement, de nombreux exemples démontrent soit la liaison possible et mutuellement exclusive de différents récepteurs sur une séquence donnée; soit une séquence composite, où se chevauchent différents éléments de réponse, qui se compétitionnent entre-eux. Ainsi une

partie du promoteur aviaire de $\beta 3$ -intégrine contient un DR9 qui peut lier RAR/RXR ou VDR/RXR et être induite par l'un ou l'autre des ligands correspondants (RA et $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) mais autant la liaison que l'induction est mutuellement exclusive et s'inhibe réciproquement (Cao et al., 1996).

On retrouve un autre exemple de cette compétition dans le promoteur de la lactoferrine qui contient un DR1 chevauchant partiellement un ERE. Malgré l'inefficacité supposé des DR1 (voir plus haut) cet élément répondait à RA et E2 (œstradiol) (Lee et al., 1995b). Cet élément est d'un intérêt particulier car il lie également COUP-TFI qui inhibe la réponse par les autres ligands. Ce récepteur orphelin a souvent été impliqué dans la modération de la signalisation à RA (Kliwer et al., 1992a; Malpel et al., 2000). Notons que COUP-TFI lie, en plus des DR1, des éléments palindromiques, comme celui TRE dans le promoteur du facteur de croissance (GH) chez le rat (Kadowaki et al., 1995). Finalement, une compétition pourrait exister entre les sites de liaisons palindromiques pour TR (TREpal) et ER (ERE) (Glass et al., 1988). Cette compétition devint encore plus complexe suite à l'identification d'une séquence identique dans le promoteur de *Cdx1* et répondant à RA (Houle et al., 2000). Ces différents exemples illustrent bien la complexité des compétitions des différents récepteurs nucléaires pour les sites de liaisons.

1.1.3.3 . La dégradation des RAR

Une autre question qui doit être abordée est celle du recyclage (ou turnover) des récepteurs. Très peu est connu à ce sujet. Il semble que la phosphorylation par la MAPkinase p38 du domaine AF-1 de RAR ainsi que l'intégrité de AF-2 semblent essentiels au ciblage des RAR γ dans la voie de dégradation par les protéosomes via le recrutement de la protéine SUG-1 (Gianni et al., 2002b; Gianni et al., 2003). Ce ciblage semble dépendent du traitement à RA. Dans des kératinocytes humains, le traitement avec RA pour 24 heures entraîne la perte de 50% du niveau protéique de RAR γ sans en altérer l'expression (Boudjelal et al., 2002).

1.1.3.4. Les corépresseurs des récepteurs nucléaires.

Les répresseurs sont uniquement nécessaires pour les récepteurs nucléaires de types non-stéroïdiens typiquement TR et RAR dont la répression active fut étudiée (Chen and Evans, 1995; Glass and Rosenfeld, 2000). Les corépresseurs sont associés aux RAR et TR qui ne sont pas lié par leur ligand et constituent donc les partenaires « de base » de ces récepteurs qui vont nécessiter la présence de leur ligand respectif pour s'en défaire

1.1.3.4.1 La boîte CoRNR

Un motif, nommé boîte CoRNR (CoRNRbox), fut décrit chez les corépresseurs et est essentiel pour leur interaction avec les récepteurs nucléaires. Sa structure est similaire au LXD, soit I/L-x-x-I/V-I (Hu and Lazar, 1999). Un motif étendu, soit Lxx I/H I xxx I/L, fut par la suite décrit et démontré comme pouvant lier, tout comme les coactivateurs, le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires. L'hélice formée par ce motif étendu serait à la base de la discrimination entre les coactivateurs et corépresseurs faite par le domaine AF-2 (Perissi et al., 1999). Des études fort élégantes où la boîte NR d'un coactivateur fut remplacée par la boîte CoRNR d'un corépresseur avaient démontré que ce coactivateur modifié liait les récepteurs nucléaires en absence de ligand (voir figure 1.3.) (Hu and Lazar, 1999).

Finalement, notons qu'alors que les répresseurs NCoR et SMRT avaient originalement été décrit comme possédant chacun deux motifs d'interaction avec les récepteurs nucléaires, un troisième motif, ne contenant qu'une portion de la boîte NR étendue, fut découvert en amont des deux autres uniquement chez NCoR (Cohen et al., 1998; Cohen et al., 2001). La portion des récepteurs nucléaires qui sert d'interaction avec la boîte NR serait aussi utilisée

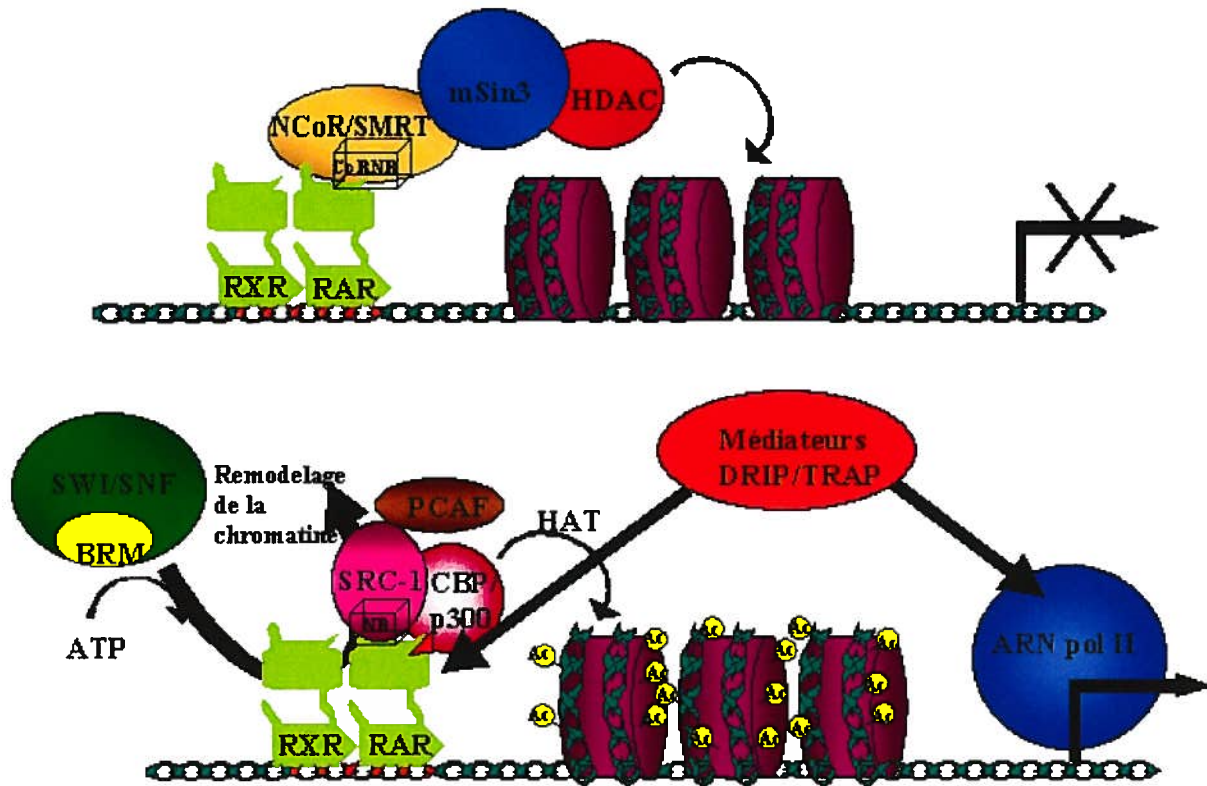


Figure 1.3. Représentation simplifiée et schématisée de l'activation de la transcription par les RAR/RXR. En haut, en absence de ligand les récepteurs nucléaires sont associés à des corépresseurs, comme NCoR qui interagiraient avec le domaine de liaison du ligand du récepteur via sa boîte CoRNR. Ces corépresseurs sont associés à des facteurs qui déacétylent les histones et recomparent la chromatine. En bas, en présence de ligand, les récepteurs ont relargué les corépresseurs et remodelent la chromatine à l'aide des complexes SWI/SNF permettant l'entrée en jeu de coactivateurs comme SRC-1 qui peut interagir avec le domaine de liaison du ligand de RAR via sa boîte NR. Les coactivateurs associés possèdent une fonction histone acétyl transférase (HAT), diminuant la force d'interaction entre les histones et l'ADN. Les facteurs médiateurs DRIP/TRAP recrutent ensuite les protéines du complexe d'initiation de transcription de base, dont l'ARN polymérase II et ses facteurs associés.

dans l'interaction avec les boîtes CoRNR et c'est la position de la douzième hélice (l'hélice activatrice du domaine AF-2 des RAR) du récepteur nucléaire, qui change d'orientation lors de la liaison du ligand, qui permettrait de discriminer entre l'interaction avec les corépresseurs ou coactivateurs (Heery et al., 1997; Renaud et al., 1995; Lefebvre et al., 1998). De plus, une protéine interagissant avec la portion charnière des récepteurs nucléaires stabiliserait par la suite l'interaction des corépresseurs (Jackson et al., 1997a).

1.1.3.4.2 Les corépresseurs NCoR et SMRT

Dans la recherche de protéines associées à TR lorsque non associé à son ligand, une protéine de 270 kDa fut identifiée et nommée NCoR (nuclear receptor corepressor, RIP-13). Elle fut démontrée comme interagissant avec TR et RAR mais non avec RXR, VDR, ER et GR (Horlein et al., 1995; Seol et al., 1996). SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor, TRAC2) fut identifiée lors d'un criblage par deux-hybrides chez la levure en utilisant RXR comme appât. Il fut ensuite démontré qu'il interagissait avec le LBD de RAR et TR couplés à RXR de façon réversible selon l'état ligandé des récepteurs, (Chen and Evans, 1995; Chen et al., 1996). Toutes deux sont d'énormes protéines modulaires d'environ 2 500 acides aminés contenant au moins trois domaines de répression en N-terminal et deux domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires en C-terminal. Malgré leur structure semblable, ils ne peuvent compenser l'un pour l'autre comme l'indique la létalité du knockout de NCoR (Jepsen et al., 2000). La propriété de RevErb (un mutant dominant répresseur de TR, (Damm et al., 1989)) d'interagir exclusivement avec NCoR (Zamir et al., 1996) et la spécificité des différents récepteurs nucléaires, voir même entre les types des RAR pour les différents corépresseurs (Wong and Privalsky, 1998) semble aussi indiquer des fonctions spécifiques. Cette spécificité *in vitro* demeure quelque peu questionnable considérant que les différents isoformes des RAR possèdent les mêmes domaines D/E, soient les régions interagissant avec NCoR et SMRT. On ne peut ignorer la possibilité que ces deux répresseurs aient des fonctions similaires mais que leur patrons d'expression spatio-temporel, quoique que qualifié d'ubiquiste,

présentent des spécificité d'expression qui soient à l'origine des différences de fonctions observées (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). À ce sujet le knockout de NCoR bloque spécifiquement certains processus développementaux tel la maturation des érythrocytes, granulocytes et thymocytes (Jepsen et al., 2000).

En faveur de rôles complémentaires de NcoR et SMRT, ajoutons que leurs domaines d'interaction C-terminal ne possèdent qu'une homologie limitée (23% et 53%). Il fut démontré que le domaine le moins conservé conférait une préférence d'interaction à RAR pour SMRT et à TR pour NCoR. L'autre domaine étant responsable de l'interaction avec RXR. Notons aussi qu'un mutant TR qui ne peut plus s'homodimériser et qui interagit forcément avec RXR a une préférence inverse et s'associe avec SMRT (Cohen et al., 2000) plutôt que NCoR qui favoriserait l'homodimérisation de TR en solution (Cohen et al., 1998), suggérant que l'hétérodimérisation avec RXR serait en partie responsable d'une préférence biaisée vers SMRT. De plus, le troisième domaine d'interaction proximal unique à NCoR semble spécifique à TR (i.e. ne lie ni RAR ni RXR) et contribue probablement à la spécificité de liaison de TR avec ce corépresseur (Cohen et al., 2001).

Le mode de répression utilisé par SMRT et NCoR est principalement la déacétylation des histones (activité HDAC). Comme ces corépresseurs n'ont pas d'activité HDAC intrinsèque ils doivent recruter des histones déacétylases via leur domaine de répression N-terminal. En effet, les complexes répresseurs mSin3A et mRPD3 qui ont été associés aux deux corépresseurs NCoR et SMRT, peuvent déacétyler les histones en s'associant à HDAC1, 2, 4, 5 (Alland et al., 1997; Heinzl et al., 1997; Jackson et al., 1997; Nagy et al., 1997; Li et al., 1997b; Laherty et al., 1998; Zhang et al., 1997b).

Les domaines de répression N-terminal de NCoR furent utilisés dans un crible double hybride et ont permis la découverte de *Siah* (mSiah2), un homologue d'une composante de la voie *sevenless* de la drosophile. *mSiah* est en fait un régulateur négatif exclusif à NCoR et le cible pour la dégradation par les protéosomes suite à l'ubiquitination de NCoR (Zhang

et al., 1998). Comme mSiah n'est pas ubiquiste et qu'il dégrade spécifiquement NcoR, il est possible qu'il génère une spécificité d'expression protéique de NcoR.

1.1.3.4.3 Les corépresseurs Sun-CoR, SURF3 et NURD

Sun-Cor est une petite protéine hautement basique de 16KDa qui contient son propre domaine de répression et ne partage aucune homologie avec NCoR et SMRT. Il semble interagir de concert avec SMRT *in vitro* et NCoR *in vivo* afin d'augmenter la répression par TR non lié à son ligand (Zamir et al., 1997). SURF-3 (TRUP/PLA-X) est un modulateur de TR et RAR sans ligand. Il diminue leur transactivation en diminuant la capacité des récepteurs qui ont fixé leur ligand de s'arrimer sur leur éléments de réponse (RARE et TRE) (Burris et al., 1995).

Le complexe NURD, quant à lui, possède une activité de remodelage de la chromatine ATP dépendante. Ce genre d'activité est généralement associé à l'activation de gènes mais ici, il semble que cette activité facilite l'action de sa sous unité histone déacétylase. Ce corépresseur serait associé à d'autres protéines HDAC dans des corps nucléaires contenant aussi SMRT. Seule une interaction de NURD avec TR a été démontrée jusqu'à maintenant et son interaction avec RAR demeure spéculative. Ce complexe se composerait d'un autre répresseur des récepteurs nucléaires sans ligand, SHARP (Downes et al., 2000; Shi et al., 2001; Xue et al., 1998).

1.1.3.5. Les Coactivateurs des RAR

Comme mentionné précédemment, les RAR ont la double fonction de répresseur et d'activateur. Plus nombreux que les répresseurs, une panoplie de régulateurs positifs ont été identifiés et constituent une collection impressionnante de protéines favorisant par divers moyens la transcription de gènes cibles des RAR. Regroupés selon leurs motifs communs ou leurs fonctions similaires, ces différents coactivateurs seront revus. Ces coactivateurs et corépresseurs lient une région semblable des RAR et leur présence est donc mutuellement

exclusive; il y a un échange des corépresseurs par des coactivateurs lors de la liaison par RA.

1.1.3.5.1. La boîte NR

Une courte séquence peptidique fut originellement identifiée chez plusieurs coactivateurs des récepteurs nucléaires, dont SRC-1 (steroid récepteur coactivator-1), RIP-160 and CBP (voir plus loin). Cette séquence, LXXLL, où L sont des leucines et X n'importe quel acide aminé, adopte une conformation d'hélice α (Nolte et al., 1998) et fut démontrée essentielle et suffisante pour lier la région AF-2 des récepteur nucléaires associés à leur ligand (Heery et al., 1997; Torchia et al., 1997). Cette séquence, la boîte NR (ou NR box), aussi nommée LXD, retrouvée en trois copies dans le NID (nuclear receptor interaction domain) de plusieurs coactivateurs permet une grande affinité de liaison avec les récepteurs nucléaires. SRC-1 contient un quatrième motif LXD en C terminal (Kalkhoven et al., 1998). Ces régions sont cruciales dans l'activation de la transcription et dans l'activation du domaine AF-2 des récepteurs nucléaires (Voegel et al., 1998). Dans un article plus récent, un rôle pour les acides aminés entourant immédiatement le pentapeptide de la boîte NR, dans la spécificité de ces coactivateurs pour les différents récepteurs des stéroïdes et rétinoïdes, fut défini. (Heery et al., 2001). Finalement une variante de ce motif, le motif FXXLL fut aussi décrite pour le coactivateur NSD1 qui contient deux NID et peut interagir avec RAR, RXR, ER et TR (Huang et al., 1998b).

1.1.3.5.2. Les activateurs de la famille SRC-1/p160

Lors d'un criblage par double hybride chez la levure avec le fragment LBD des récepteurs nucléaires, le coactivateur SRC-1 (NCoA-1/p160) fut identifié (Onate et al., 1995). Il peut stimuler la transactivation d'un récepteur nucléaire associé à son ligand (PR,GR, ER, TR, RXR) via l'interaction du domaine AF-2 de ce dernier et de sa boîte NR. Les molécules de la famille p160/SRC-1 contiennent, en plus des motifs LXXLL, un domaine de liaison à CBP/p300, un à CARM1, (voir plus loin les fonctions spécifiques de ces protéines), un

domain bHLH et PAS permettant l'interaction avec d'autres protéines, des domaines possédant une activité acétyltransférase (Spencer et al., 1997). Des domaines d'activation AD1 et AD2 transférables ont été définis et correspondent en fait aux régions d'interactions avec CBP et CARM1 respectivement (McKenna and O'Malley, 2002).

L'identification de nouvelles protéines contenant les mêmes domaines protéiques sus-mentionnés (à l'exception du quatrième motif LXD) élargissent la famille. SRC-2 (TIF2/GRIP1/N-CoA-2) découvert en 1995 présentait une forte homologie à SRC-1 (Voegel et al., 1996) et pouvait également transactiver les récepteurs nucléaires dont TR, VDR, RAR, RXR via leur région AF-2 (Hong et al., 1997). SRC-3 (p/CIP/RAC3/ACTR/AIB-1/TRAM-1) fut identifié deux ans plus tard comme activateur de TR et interagit avec CBP/p300 (Torchia et al., 1997). Il a aussi démontré qu'il interagit positivement avec les récepteurs RAR, TR, RXR, GR, PR *in vitro*, lorsqu'ils fixent leur ligand (Chen et al., 1997; Li et al., 1997a) et ER dans des lignées de cellules tumorales mammaires (Anzick et al., 1997).

Notons également que l'ajout de ces coactivateurs pouvait renverser l'effet de répression par compétition, ou titrage (squenching) initialment causé par l'ajout d'un excès de récepteur nucléaire. Dans des essais de transactivation par PR (Onate et al., 1995) où un excès de ER titrait des coactivateurs, l'ajout de SRC-1 pouvait surmonter cette compétition, ce qui démontre le caractère limitant et le rôle essentiel de ce coactivateur pour la transactivation par PR.

1.1.3.5.3. Les activateurs acétyltransférases PCAF/CBP/p300

L'un des coactivateurs des récepteurs nucléaires, PCAF, utilise SRC-1 comme un pont moléculaire. PCAF, tout comme SRC-1, possède une activité histone acétyl transférase (HAT) spécifique pour les histones H3 et H4 (Spencer et al., 1997). PCAF est l'homologue de GCN5 chez la levure. Bien qu'il ne possède pas de motif LXXLL et ne puisse par conséquent pas lier directement les domaines AF2 des récepteurs nucléaires, PCAF peut

interagir directement avec le domaine de liaison à l'ADN du dimère RAR/RXR liant RA (Blanco et al., 1998). Il interagit aussi avec les protéines CBP (CREB Binding Protein) et p300 (Blanco et al., 1998) qui possèdent également une fonction HAT (voir plus bas). Finalement, il a été retrouvé au cœur de complexes multiprotéiques d'activation de la transcription avec plusieurs TAF (TATA box Binding Protein Associated Factors) similairement à GCN5 dans les complexes SAGA chez la levure (Grant et al., 1998).

CBP et P300 sont des coactivateurs qui possèdent également une fonction HAT, un domaine d'interaction avec SCR-1 via le domaine AD1 de ce dernier (Chakravarti et al., 1996; Grant et al., 1998; Kamei et al., 1996; Sheppard et al., 2001) ainsi qu'un motif LXXLL permettant l'interaction avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires (Heery et al., 1997). Ils sont hautement conservés entre-eux mais ont des fonctions distinctes au cours du développement (Goodman and Smolik, 2000). Le recrutement de CBP/p300 dans le complexe d'activation de la transcription des récepteurs nucléaires est d'autant plus important que sa quantité dans la cellule est limitante (dans certains types cellulaires du moins). Ce qui fait que l'activation de la transcription de gènes cibles des récepteurs nucléaires, suite à l'ajout d'un ligand, entraîne une déplétion de la quantité de CBP/p300 disponible pour activer d'autres gènes cibles (Kamei et al., 1996). C'est encore ici le principe de la compétition par titration qui s'applique et qui fut illustrée entre autres pour GR et RAR (Schule et al., 1990; Tasset et al., 1990).

Comme on le voit, plusieurs coactivateurs des récepteurs nucléaires dont les RAR utilisent l'acétylation des histones comme moyen de faciliter la transcription des gènes cibles. En effet ce mécanisme affaiblit la force d'interaction entre les histones et l'ADN favorisant son accessibilité pour la transcription. L'une des façons d'étudier ce mécanisme est l'usage de la trichostatine A (TSA) qui inhibe la déacétylation des histones (bloque HDAC1) et par conséquent maintient la chromatine dans un état hyperacétylé. Bien que ce traitement induise l'activité de la majorité des gènes actifs d'une cellule, il a été démontré que le TSA avait un effet synergistique sur l'activation du promoteur de RAR β 2 contenant un RARE

lorsque mis en présence de RA. Une synergie d'environ 50 fois fut observée sur ce promoteur (Minucci et al., 1997). Cette suractivation des gènes cibles de RA se traduisait également par une différenciation d'un plus grand nombre de cellules P19 en neurone lorsque comparé au traitement avec RA seul.

On peut donc en conclure que, puisque l'acétylation induite par TSA synergisait avec l'action de RA, ce dernier doit jouer au moins un autre rôle dans l'activation de gènes cibles. Logiquement, si son seul effet était l'activité HAT (histone acétyl transférase) de ses coactivateurs, l'ajout de RA en plus de TSA n'aurait pas beaucoup plus d'effet que TSA seul. Une autre fonction associée aux coactivateurs des RAR est justement de remodeler la chromatine de façon ATP dépendente.

1.1.3.5.4. Le complexe SWI/SNF/BRG1/BRM et le remodelage de la chromatine

Tous les gènes sont empaquetés sous forme de chromatine dont la conformation est modifiée selon le besoin d'activer ou de réprimer l'expression d'un gène donné. Cette plasticité est entre autre conférée par un complexe enzymatique activé par de l'ATP dont le rôle est de remodeler la chromatine. Le complexe SWI/SNF, défini en premier chez la levure (Cote et al., 1994), rend l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription avec une activité HAT puis à la machinerie transcriptionnelle de base (Dilworth and Chambon, 2001). Son homologue mammalien, d'une taille approximative de 2 MD fut identifié et contient toujours l'une ou l'autre des sous-unités ATPase BRM ou BRG1 (Klochender-Yeivin et al., 2000) le tout pouvant remodeler les nucléosomes de la région. Les sous-unités ATPases présentent une certaine spécificité. Alors que les complexes contenant BRG1 préfèrent les facteurs de transcription à doigts de zinc (incluant les facteurs GATA, RAR/RXR et KLF), ceux utilisant BRM comme ATPase sont associés avec des facteurs de transcription de la voie *Notch* comme *Hes1* et *Hes5* (Kadam and Emerson, 2003).

Notons que le membre de la famille SWI/SNF ISWI aurait un rôle particulier sur le remodelage de la chromatine et est requis pour une meilleure association des récepteurs

nucléaires avec leur séquences cibles, en absence de ligand. L'ATPase ISWI intervient donc en absence du ligand, avant son entrée en jeu, alors que le complexe SWI/SNF agit sur les nucléosomes plus proximaux pour permettre l'arrimage des facteurs de la machinerie de transcription de base (Cairns, 1998; Di Croce et al., 1999; Dilworth and Chambon, 2001; Langst and Becker, 2001).

1.1.3.5.5 Le complexe médiateur DRIP/TRAP

Lors de criblage protéique à l'aide d'une fusion GST-domaine LBD de VDR (immobilisé sur colonne) le complexe médiateur DRIP/TRAP fut identifié (Rachez et al., 1998). La sous-unité cruciale de ce complexe, DRIP205 (TRAP220) contient elle aussi des domaines LXXLL pouvant activer la fonction AF-2 de différents récepteurs dont l'hétérodimère RAR/RXR (Shao et al., 2000). Une partie de la spécificité de ces motifs pour les différents récepteurs proviendrait des séquences entourant le motif LXXLL (Coulthard et al., 2003). Cependant ni cette sous-unité ni aucune autre du complexe ne possède d'activité HAT. De plus, comme ce complexe interagit directement avec le même domaine des récepteurs nucléaires que les membres de la famille p160 (Rachez et al., 2000; Bikle et al., 2003) il est supposé que ce complexe fait partie d'un mécanisme en plusieurs étapes où le complexe de remodelage de la chromatine ISWI agirait en premier pour rendre plus forte l'association RAR/RXR sur l'ADN, puis rendre le tout plus accessible aux coactivateurs suivants le complexe SRC, CBP, PCAF. Ces derniers viendraient acétyler les histones d'un promoteur lié par un récepteur nucléaire associé à son ligand pour éventuellement être remplacés par le complexe DRIP/TRAP dont le rôle présumé serait de recruter l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription (Bikle et al., 2003; Gu et al., 1999; Dilworth and Chambon, 2001). Tous ces complexes servent de médiateur à la signalisation par les RAR et transmettent le signal d'activation de la transcription (voir figure 1.3.).

1.1.3.5.6. D'autres modulateurs positifs de la transactivation par les récepteurs nucléaires

Trip/Sug-1, E6-AP et RPF-1 sont des ubiquitines ligases nécessaires à la transactivation de récepteurs nucléaires dont AR, ER, TR, PR, RAR et RXR. Ceci suggère que la dégradation protéique est importante dans la transactivation (Lee et al., 1995a; Rubin et al., 1996). SRA (Steroid Receptor RNA Activator) quant à lui, fonctionne comme messenger et non comme protéine afin d'activer la fonction AF-1 des récepteurs nucléaires (Lanz et al., 1999; Lanz et al., 2002) et fait partie du même complexe riboprotéique que SRC-1. Il semble surtout associé à la transactivation par ER (Cavarretta et al., 2002; Murphy et al., 2000). CARM-1 et PMRT-1 sont deux méthylases catalysant l'ajout de groupement méthyls sur les résidus arginine des queues des histones H3 et 4 sur des promoteurs contrôlés par des récepteurs nucléaires en présence de ligand (Wang et al., 2001). Carm-1 fait partie du complexe d'activation SRC-1 (Chen et al., 1999). Plusieurs autres coactivateurs dont la fonction semble spécifique à un seul type de récepteur nucléaire sont connus (dont PGC-1, pour les PPAR (Puigserver et al., 1998)) mais sortent du cadre de ce survol.

1.1.4. Les ligands des récepteurs de l'acide rétinoïque

La vitamine A et ses dérivés métaboliques actifs sont essentiels au maintien de plusieurs fonctions vitales ainsi qu'au développement embryonnaire normal revue par Sporn (Sporn et al., 1994). Des modèles d'animaux nourris avec des diètes déficientes en vitamine A (VAD) ont, il y a longtemps, montré la nécessité de la vitamine A dans les fonctions d'homéostasie (Wolbach and Howe, 1978). Des modèles de femelles (rates) gestantes VAD ont démontré l'importance de cette vitamine pour le développement normal des embryons (Wilson 1953). Il a également été montré que l'acide rétinoïque pouvait efficacement remplacer la vitamine A dans le développement embryonnaire sauf au niveau de la vision (défaut des photorécepteurs) et ne peut corriger la stérilité qu'à de plus fortes concentrations de RA (Thompson et al. 1964).

Nous savons désormais que la vitamine A exerce son effet via l'action commune de deux sous-familles de récepteurs nucléaires, les RAR (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987) et les RXR (Mangelsdorf et al., 1990). Comme ces facteurs de transcription

deviennent des activateurs transcriptionnels en présence de leur ligand il est important de faire un survol de leur métabolisme, de leur biodisponibilité et des conséquences d'une altération des niveaux normaux de RA.

1.1.4.1. Le métabolisme de l'acide rétinoïque

1.1.4.1.1. Apport et stockage de la vitamine A

Contrairement à la majorité des hormones liant les récepteurs nucléaires de la classe I et II qui sont synthétisées et/ou relâchées en réponse à une stimulation, l'apport en acide rétinoïque est dépendant de l'alimentation pour l'obtention de son précurseur, la vitamine A (par définition d'une vitamine). Il faut donc qu'un contrôle très serré de la synthèse et de la dégradation de l'acide rétinoïque soit appliqué afin de maintenir des niveaux appropriés de RA. Les principales formes de la vitamine A sont la provitamine A (des caroténoïdes végétaux, principalement le β -carotène), ou les esters de rétinyl provenant des viandes ingérées. Les esters sont convertis en rétinol dans la lumière intestinale avant même leur absorption par les cellules entérocytes de l'intestin alors que les caroténoïdes sont convertis en rétinol à l'intérieur des entérocytes. Dans ces cellules, le rétinol est couplé à des longues chaînes carbonées par deux enzymes responsables de cette estérification, ARAT et LRAT. Ces esters de rétinyl sont transportés, à l'aide de chylomicrons, jusqu'au foie (Blomhoff et al., 1990). Le foie métabolise et stocke la majorité du rétinol sous forme estérifiée.

1.1.4.1.2 Mobilisation des stocks de rétinol

En situation de besoin en RA, le foie relâche du rétinol, suite à l'action de la *retinyl ester dehydrogenase* (REH). Le rétinol est lié à une autre molécule, une protéine de 21 kDa que le foie synthétise, le *retinol binding protein* (RBP). Cette protéine est retrouvée dans plusieurs tissus de l'organisme et à partir du jour 7 chez l'embryon de souris, consistant avec le rôle de RA dans l'embryogenèse (Sapin et al., 1997) comme discuté plus loin. Paradoxalement, le knockout de RBP ne cause qu'un retard de la vision et une dépendance

à la présence de vitamine A dans l'alimentation. Aucune autre conséquence ne semble découler de l'incapacité à mobiliser le rétinol stocké par le foie (Quadro et al., 1999) diminuant dramatiquement l'intérêt originalement porté à RBP. Il est à noter que RA peut aussi se lier à d'autres molécules lipophiliques du sang tel l'albumine, qui pourrait compenser pour la perte du transporteur spécifique RBP (Goodman, 1984).

Le duo RBP-rétinol est aussi liée dans un ratio 1 :1 à la protéine TTR (transthyréline) qui, par sa masse de 55 kDa rend l'ensemble moins susceptible à la filtration par les reins (Monaco et al., 1995). Certaines études suggèrent que l'importation du rétinol dans la cellule se ferait via des récepteurs membranaires spécifiques au complexe rétinol-RBP (Sundaram et al., 1998; Bavik et al., 1992), mais d'autres études ont démontré que ce n'était probablement pas le cas car le transfert du rétinol de RBP à CRBP peut s'effectuer indépendamment d'un quelconque récepteur membranaire (Hodam and Creek, 1998).

1.1.4.1.3. L'acide rétinoïque dans la cellule du rétinol au rétinol

À l'intérieur de la cellule, on retrouve une partie du rétinol lié à la protéine *cellular retinol binding protein* (CRBP). CRBPII est impliquée dans la présentation du rétinol aux enzymes d'estérification LRAT dans le petit intestin. CRPBI quant à lui est présent dans une grande variété de tissus adultes et embryonnaires où, lié au rétinol ou au rétinol, il permettrait à diverses réactions enzymatiques de deshydrogénation (oxydation) de prendre place (Giguere, 1994).

L'oxydation du rétinol en RA requiert deux étapes, médiées par deux familles d'enzymes. Premièrement, les alcool deshydrogénases (ADH), qui oxydent le groupement alcool en l'aldéhyde correspondant (rétinol en rétinol) et deuxièmement les rétynalaldéhyde deshydrogénases (RALDH) convertissant la fonction aldéhyde en acide carboxylique produisant finalement l'acide rétinoïque.

La première réaction est peu spécifique et plusieurs enzymes différentes peuvent déshydrogéner plusieurs substrats incluant le rétinol all-trans et 9-cis. Notons ADH1,2 et 4 qui peuvent convertir soit le 9-cis soit le all-trans rétinol en leur intermédiaire rétinaldéhyde correspondant. Adh1 a un patron d'expression fort limité (les reins) et son rôle comme générateur de RA embryonnaire est par conséquent fort limité; de plus son knockout n'indique aucun défaut relié à une déficience du métabolisme du rétinol (Deltour et al., 1999a; Deltour et al., 1999b; Vonesch et al., 1994). Adh4, par contre, a un patron d'expression qui correspond beaucoup mieux aux zones riches en RA de l'embryon et est l'enzyme la plus efficace de sa catégorie à métaboliser le all-trans rétinol en all-trans rétinol. Son inactivation génique n'est pas létal en soit mais rend l'embryon fort susceptible à une carence alimentaire en vitamine A, ce qui porte à croire que Adh4 pourrait être l'enzyme principalement responsable de la conversion all-trans rétinol en all-trans rétinol, mais qu'il y aurait une certaine redondance fonctionnelle avec les autres enzymes (Deltour et al., 1999b).

Notons aussi RDH5 qui ne sert qu'à la conversion du 9-cis rétinol en 9-cis rétinol et du 11-cis rétinol en 11-cis rétinol. Cette dernière forme est utilisée comme telle dans la fonction de la vision où la lumière modifie sa conformation et sa relaxation entraîne une cascade d'événements causant la dépolarisation des neurones photosensibles de l'œil (Pepe et al., 1987; Applebury and Hargrave, 1986). Le 11-cis n'a aucune fonction rapportée dans la transcription de gènes cibles de RA. Toutes ces enzymes ADH utilisent le NAD comme cofacteur enzymatique. RoDH1,2 et ADH8 sont des enzymes qui permettent la transformation inverse (rétinal en rétinol) en utilisant le rétinol comme substrat et le NADPH comme cofacteur. Il n'existe aucune enzyme connue pouvant reconverter directement le 11-cis rétinol en 11-cis rétinol. Ceci parce que cette conversion est contrôlée par la lumière par la réaction dite de *photobleaching* où la lumière isomérisé des quantités massives de 11-cis en all-trans rétinol qui lui doit retourner sous la forme all-trans rétinol (Duester, 2000).

1.1.4.1.4. L'acide rétinoïque dans la cellule du rétinale à l'acide carboxylique

La seconde étape de conversion est réalisée par la famille des aldéhydes deshydrogénases (ALDH). ALDH1 est NAD dépendant et peut médier la conversion du all-trans et 9-cis rétinale en acide rétinoïque correspondant. Cependant, son efficacité est bien moindre que celle de la RALDH2. De plus, le patron d'expression de ALDH1 est limité à la région crânienne de l'embryon du jour 9.0 à 10.5, dont l'œil. Ces tissus sont principalement dénués d'expression de RALDH2. Ces deux enzymes jouent donc des rôles complémentaires dans la production de RA (Haselbeck et al., 1999). RALDH2 est bien plus spécifique que ALDH1, n'acceptant pour substrat connu que le all-trans rétinale qu'il métabolise en all-trans RA. L'inactivation génique (*knockout*) de cette enzyme a révélé qu'elle était en grande partie responsable de la production de RA chez l'embryon indispensable au développement normal de ce dernier. L'inactivité d'un rapporteur RARE-LacZ confirmait que la mutation de RALDH 2 réduisait les niveaux de RA présents chez l'embryon de souris en gastrulation à des niveaux indétectables par cette méthode sauf dans l'œil en développement (où RALDH1 et 3 sont présents). La spécificité du rôle de cette enzyme fut investiguée par le traitement de mutants RALDH2 avec all-trans RA. Ce traitement corrigeait presque complètement le phénotype. Cependant il est difficile d'affirmer si les imperfections de la correction du phénotype sont dues à des dosages de RA non idéaux (i.e. non physiologique) ou plutôt à un autre rôle de RALDH2, sur un autre substrat, forcément non corrigé par l'administration de RA (Niederreither et al., 1999; Niederreither et al., 2000; Niederreither et al., 2002d). Une troisième enzyme est en mesure de générer du all-trans RA à partir du all-trans rétinale, l'ALDH6 (RALDH3). Cette enzyme est très semblable à la RALDH2 mais est exprimée de façon fort spécifique dans la partie ventrale de la rétine de la souris et du poulet (McCaffery et al., 1999; Yoshida et al., 1998).

1.1.4.1.5. La protéine cellulaire de liaison à l'acide rétinoïque, CRABP

L'acide rétinoïque ainsi généré peut soit activer les récepteurs de l'acide rétinoïque ou être lié par les *cellular retinoic acid binding proteins* I et II (CRABPI et II) (Stoner and Gudas,

1989; Blomhoff et al., 1990; Ruberte et al., 1992). L'expression de ces deux molécules est induite par RA (Durand et al., 1992; Wei et al., 1989) et leur rôle supposé est de contrôler la quantité de RA libre pouvant lier les récepteurs de même que de présenter l'excès de RA aux cytochromes p450 en vue de sa dégradation (Fiorella and Napoli, 1991). Leur patron d'expression complémentaire aux RAR dans le bourgeon du membre suggère aussi un rôle comme modérateur de la signalisation par RA (Dolle et al., 1989). De plus, une surexpression de CRABP I dans des cellules F9 (dérivées de carcinomes embryonnaires) empêche en partie la différenciation RA-dépendante de ces cellules vers des voies endodermales (Boylan and Gudas, 1991). Notons aussi que seul le all-trans RA peut être lié par les CRABP (Fiorella et al., 1993; Fogh et al., 1993). En contre partie, mentionnons que les études par inactivation génique de ces gènes chez la souris n'ont pas confirmé les hypothèses sus-mentionnées et le double mutant CRABPI-II est essentiellement normal sauf pour une polydactylie des membres antérieurs. Étonnamment ces souris ne présentaient pas de sensibilité accrue aux rétinoïdes (Lampron et al., 1995), suggérant que leur rôle dans la biodisponibilité de RA soit pour le moins très subtil (Fawcett et al., 1995).

1.1.4.1.6. Le catabolisme de l'acide rétinoïque et le rôle des cytochromes p450

L'acide rétinoïque produit est finalement dégradé en métabolites inactifs, par des membres de la famille des cytochromes p450 dont font partie les CYP monooxygénases CYP26A1 (Ray et al., 1997), B1 (MacLean et al., 2001; White et al., 2000) et C1 (Taimi et al., 2003; Tahayato et al., 2003). Ces enzymes dégradent l'acide rétinoïque en dérivés 4-hydroxy-RA, 18-hydroxy-RA puis en 4-oxo-RA qui sont plus polaires (White et al., 1996) et peuvent être catabolisés en plusieurs dérivés plus polaires. Bien que certaines études confèrent un rôle actif à certains métabolites (Pijnappel et al., 1998) des études récentes impliquant la correction du mutant CYP26A1 par mutation de RALDH2 (Niederreither et al., 2002b) semblent démontrer le contraire.

Le knockout de certaines enzymes, revues dans les sections précédentes, cause soit une accumulation de RA ou un manque en RA. Ces phénotypes seront détaillés plus loin en

parallèle avec les études d'excès ou de carence alimentaire en RA qui causent des phénotypes semblables.

1.1.4.2. La biodisponibilité de RA

L'un des aspects intéressants du fonctionnement des RAR est que non content de devenir des activateurs transcriptionnels lorsqu'associés à leur ligand, ils possèdent une fonction de répresseurs actifs qui s'est révélée être cruciale (Chambon, 1996). De cette affirmation découle la nécessité de réguler de façon très précise le patron spatio-temporel de distribution du ligand, RA. Plusieurs études ont tenté de déterminer la quantité de RA, ou de ses différents métabolites présent dans les différents tissus de l'embryon au cours du développement. Ces études ont souvent été menées dans divers modèles animaux : le poisson zèbre (Costaridis et al., 1996), la grenouille (Azuma et al., 1990; Creech et al., 1994; Kraft et al., 1994), le poulet (Chen et al., 1992; Wagner et al., 1992; Maden et al., 1998) et la souris (Hogan et al., 1992; Horton and Maden, 1995; Rossant et al., 1991; Wagner et al., 1992)

1.1.4.2.1. Les techniques d'étude de biodisponibilité

Trois outils ont été principalement utilisés pour étudier le patron de distribution des rétinoïdes actifs dans l'embryon en développement. Le HPLC (high pressure liquid chromatography) est sensible et permet de discerner plusieurs formes de rétinoïde (Maden et al., 1998). Par contre, il ne fournit que peu d'information quant à la localisation exacte des ligands dans l'embryon. Deuxièmement, l'usage de lignées cellulaires transfectées de façon stable avec un gène rapporteur lacZ sous le contrôle d'un RARE permet de juger du contenu en rétinoïdes actifs d'un tissu. Ceci est fait en l'incubant sur un tapis de cette lignée cellulaire qu'on soumet ensuite à une révélation pour l'activité β -galactosidase des cellules (Wagner et al., 1992). Plus de cellules deviennent bleues, plus le tissu contenait des rétinoïdes actifs. La troisième technique est une modification de la seconde. Le même mini-gène RARE-hsp-lacZ est inséré par transgénèse dans l'embryon ce qui permet de suivre le

contenu en rétinoïdes actifs de tous les tissus embryonnaires au cours du développement (Rossant et al., 1991; Mendelsohn et al., 1991). Ses limitations sont qu'elle ne permet pas, par exemple, de faire la distinction entre le all-trans RA et son isoforme 9-cis. De plus, cette technique suppose que l'enzyme β -galactosidase se comporte comme RA alors que due à sa stabilité, cette protéine est susceptible de persister dans des cellules d'où RA a disparu.

1.1.4.2.2. La distribution d'acide rétinoïque chez l'embryon de souris

Si on intègre ces différentes techniques, on peut résumer la distribution spatio-temporelle de l'acide rétinoïque dans l'embryon en développement comme suit. Premièrement, notons que des études de HPLC ont démontré que seul le all-trans RA et all-trans rétinol étaient présents (Horton and Maden, 1995). La forme didéhydro-RA, 4-oxo et surtout l'isoforme 9-cis RA surprennent par leur absence. Plusieurs autres modèles animaux avaient permis de déceler la présence de ces rétinoïdes dans l'embryon en développement (Maden et al., 1998; Costaridis et al., 1996) et plusieurs essais *in vitro* avaient conféré des rôles à la signalisation par le 9-cis RA (Mangelsdorf et al., 1992; Heyman et al., 1992; Lu et al., 1997; Thaller et al., 1993).

Le rapporteur LacZ sous le contrôle du promoteur d'un triple RARE ne présente pas d'activité avant le jour embryonnaire 7.5 (E7.5). À ce stade, toute la région postérieure de l'embryon contient des rétinoïdes actifs comme en témoigne une forte coloration bleue tout le long de la ligne primitive jusqu'au nœud, une structure servant d'organisateur (Hogan et al., 1992). Une journée plus tard à E8.5, le transgène RARE-LacZ est toujours actif dans le mésoderme du tronc et dans le tube neural et cesse d'être exprimé antérieurement juste sous le niveau du sulcus préotique. Son expression a régressé du bourgeon de la queue, qui contient les vestiges de la ligne primitive, s'est retirée de la région du neuropore, où le tube neural n'est pas encore refermé sur lui-même et elle se fixe à ligne imaginaire correspondant environ au niveau du dernier somite généré (Rossant et al., 1991). Notons

deux points importants qui seront repris plus tard, premièrement la disparition de RA du bourgeon de la queue se fait simultanément à l'apparition de l'enzyme CYP26A1 (Iulianella et al., 1999; Ray et al., 1997) dans cette même région et deuxièmement qu'aucun gradient n'est observé le long de la zone contenant RA contrairement à une hypothèse populaire selon laquelle un gradient de RA serait responsable du patterning du mésoderme dans le bourgeon de la queue ou du neurectoderme du rhombencéphale (Blumberg et al., 1997; Dupe and Lumsden, 2001; Marshall et al., 1996).

Par HPLC, le groupe de Maden (Maden et al., 1998), a étudié la distribution de RA chez l'embryon de souris entre le jour E9.0 et E13.5. Ses principales observations sont l'intense concentration de RA présente dans le tube neural et la quasi-absence de RA dans le mésencéphale et télencéphale. Les niveaux de rétinol observés ne présentaient pas de corrélations très consistantes avec ceux de RA et demeuraient, en moyenne 5 fois plus élevés que ceux de RA. Des analyses détaillées à ces stades du développement furent aussi réalisées (Balkan et al., 1992; Iulianella et al., 1999; Maden et al., 1998), à l'aide de lignées LacZ rapporteur. Entre le jour E8.5 et E11.5 le bourgeon de la queue, (i.e. la région postérieure au somite le plus récent), était toujours dépourvu de RA, contrairement à la région du tronc contenant les somites (voire figure 1.4. pour un résumé). À E11.5 les niveaux en RA de la queue et tronc sont de beaucoup diminués, corroborant les résultats de HPLC. Finalement il est important de noter que si observé 3.5 heures après le traitement exogène avec RA, le niveau de RA dans la queue devient très important, mais que si observé après 6 heures, le tissu a métabolisé tout le RA présent. Ceci révèle la présence d'un mécanisme maintenant une concentration de RA minimum dans l'extrémité caudale de l'embryon à stade. Ce mécanisme c'est l'enzyme CYP26A1 qui est induit par RA puis qui le métabolise rapidement. CYP26A1 contient un RARE qui lui permet d'être induit en circonstance d'excès de RA et agit comme mécanisme de protection contre les variations indésirées de ce métabolite. On peut illustrer cette relation par le mutant CYP26A1 où l'on retrouve une accumulation anormale d'acide rétinoïque dans le bourgeon de la queue au stade E8.5 (Abu-Abed et al., 2001; Abu-Abed et al., 1998; Sakai et al., 2001).

1.1.4.2.3. La distribution des gènes contrôlant les niveaux de RA chez l'embryon de poulet

Une façon indirecte de vérifier les tissus contenant, ou non, de l'acide rétinoïque est d'étudier la distribution des gènes responsables de sa synthèse et de sa dégradation. Il a été observé que l'expression de gènes responsables de la synthèse/dégradation de RA correspondait à des aires complémentaires. Ainsi, chez le poulet, des études très détaillées de cette complémentarité ont vu le jour (Maden, 1999; Swindell et al., 1999). RALDH2, la principale enzyme responsable de la conversion du rétinol en all-trans RA se retrouvait dans la ligne primitive et autour du nœud de Hensen. Aux stades subséquents, son expression se retirait de l'extrémité postérieure du bourgeon de la queue où l'on trouve les vestiges de la ligne primitive. RALDH2 est alors exprimé dans le mésoderme segmenté et dans les lames latérales du mésoderme. Inversement, l'expression de CYP26A1 est, au départ, détectée dans un croissant de cellules immédiatement antérieures au nœud de Hensen et qui coïncide avec la limite théorique entre le mésencéphale et le prosencéphale en devenir. Son expression est absente du nœud, puis des somites et des lames latérales. CYP26A1 demeure présente dans le mésencéphale et le prosencéphale en devenir pour ensuite se limiter au rhombomère 2. On détecte CYP26A1 dans les rebords de la gouttière neurale et dans le bout de la queue contenant les vestiges de la ligne primitive où son expression s'étend antérieurement de façon concomitante avec le recul du front d'expression de RALDH2 (figure 1.4). Notons finalement la présence de CYP26A1 dans l'ectoderme du bourgeon des ailes (Swindell et al., 1999).

Une notion importante qui découle de cette comparaison est non seulement la complémentarité générale de l'expression de ces gènes, mais aussi le rhombencéphale qui se développe entre l'expression de CYP26A1 dans les portions plus antérieure du neurectoderme et RALDH2 dont l'expression de termine tout juste à la limite postérieure du rhombencéphale. Cette structure, qui sera ultérieurement divisée en rhombomères, semble se développer entre les effets opposés de ces deux enzymes qui entraînent possiblement un gradient de concentrations de RA dans cette partie du neurectoderme

(Maden, 1999) et bien que les rapporteurs RARE-LacZ n'ont jamais pu le démontrer, la stabilité de la β -galactosidase pourrait masquer cette distribution. La distribution de RA chez le poulet correspond très bien aux zones exprimant RALDH2 et est exclue des zones riches en CYP26 (Maden et al., 1998) à l'exception peut-être des bourgeons du membre où une certaine quantité de RA fut détectée malgré la présence transitoire de CYP26B1.

1.1.4.2.4. La distribution des gènes contrôlant les niveaux de RA chez l'embryon de souris

Chez l'embryon murin comme celui de poulet, la présence d'acide rétinoïque semble fort bien correspondre aux tissus exprimant RALDH2. Vers E7.0-7.5, ce gène est exprimé dans toute la partie postérieure de l'embryon et ce plus fortement tout juste au sortir de la ligne primitive. Son expression s'étend sur toute la largeur de l'embryon et jusqu'à une limite tout juste rostrale au nœud mais duquel elle est absente. Son expression demeure absente des replis de la tête. Durant la somitogénèse, vers E9.5, RALDH2 est présent dans le mésoderme du tronc, segmenté et non segmenté. Son expression est plus forte dans les somites plus rostraux et diminue graduellement jusqu'au somite formé le plus récemment. Dans le bourgeon, de la queue, il n'est exprimé qu'à deux petits sites sur la portion ventrale de l'embryon près de la base de l'allantois. À E9.5, son expression est semblable et on note un enrichissement à la base des bourgeons des membres supérieurs et dans l'aire de bourgeonnement des membres inférieurs. Plus tard, il est exprimé faiblement dans les membres dans des zones très précises, soient les artères principales et les zones interdigitales (Niederreither et al., 1997).

De façon complémentaire à ce profil d'expression se trouve celui des deux enzymes principalement responsables de la dégradation de RA chez l'embryon de souris, CYP26A1 et CYP26B1 (voir figure 1.4.), (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001). Autour de E7.0-7.5, on retrouve CYP26A1 dans les replis de la tête et il est exclu de la moitié postérieure de l'embryon incluant le nœud. À E8.0-8.5, CYP26A1 est exprimé dans le bourgeon de la queue, autour du neuropore et dans le rhombomère 2 alors que CYP26 B1 est exprimé dans

les rhombomères 3, 5 puis 6 du rhombencéphale. À E10.5, CYP26B1 est fortement observé dans les bourgeons des membres postérieurs et antérieurs, puis éventuellement dans tout le pourtour du membre en développement à l'exception de la crête apicale de l'ectoderme (AER) (MacLean et al., 2001).

On note que la complémentarité d'expression des gènes de dégradation de RA avec celle de RALDH2, appuyée par les études de distribution du ligand, semble confirmer que ces trois enzymes, CYP26A1, B1 et RALDH2 contrôlent une grande part de la biodisponibilité de RA dans l'embryon de souris en développement. Ces patrons d'expression complémentaires semblent s'assurer que RA est retrouvé là où il faut et est absent des zones où il est indésirable. Les patrons de distribution des enzymes de même que les études de localisation embryonnaire de RA réfutent la théorie du gradient AP de RA le long de l'embryon en développement. Nous retrouvons plutôt une situation où des zones riches en RA cotoient des zones d'où il est absent. Ainsi le bourgeon de la queue passe d'un état riche en RA vers E7.5 pour en être complètement dépourvue au stade E8.5; sans jamais présenter de gradient perceptible. Il demeure possible que le gradient de RA existe mais soit de nature temporelle plutôt que de concentration. Ainsi la dose perçue par les cellules peut être graduée en fonction du temps d'exposition et non nécessairement en fonction de la concentration absolue de RA.

Une étude récente confirmait que la très grande majorité de l'acide rétinoïque de l'embryon de souris était générée via RALDH2 alors que de petites zones, confinées aux yeux, la région faciale et la portion cranio-faciale de l'embryon semblaient dépendre des autres membres de cette famille pour produire RA (Niederreither et al., 1997; Niederreither et al., 2002d; Niederreither et al., 2002b).

De façon intéressante des embryons mutants RALDH2 dont le développement, normalement bloqué à E8.5, est maintenu par administration maternelle de RA, présentent des zones de génération de RA inattendues. On observe l'activité d'un rapporteur RARE-lacZ dans la moelle épinière de ces embryons, zone qui ne présentent normalement qu'une

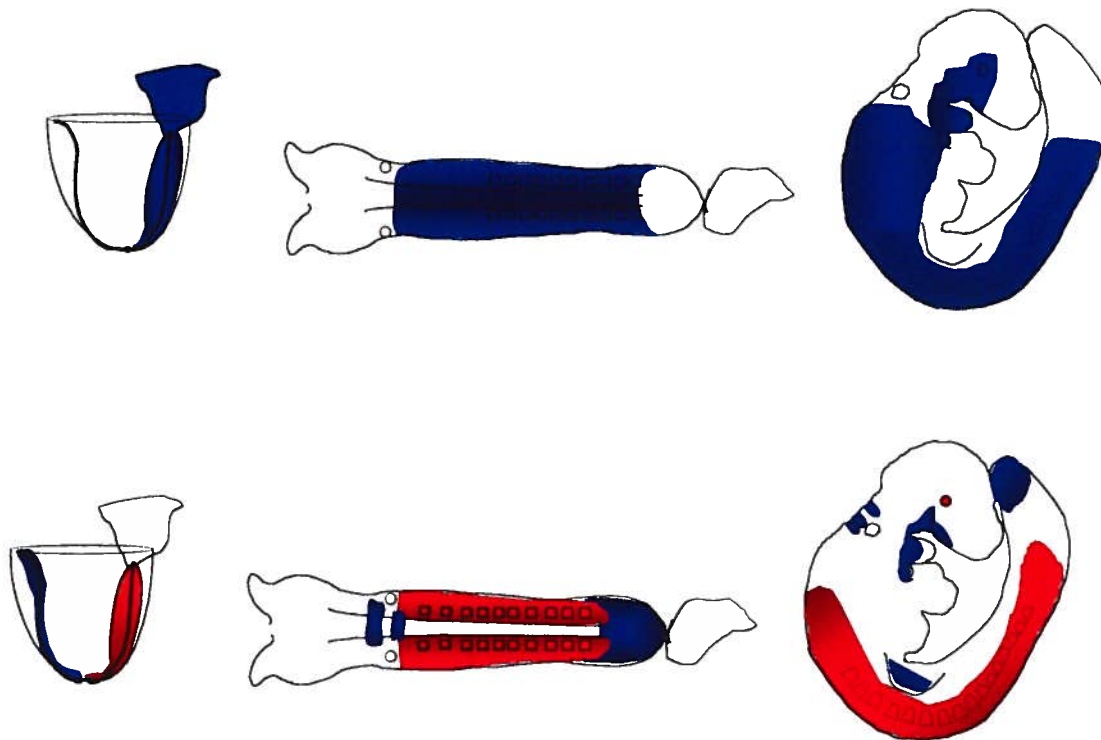


Figure 1.4. Résumé schématisé de la distribution de RA (en bleu) chez l'embryon de souris (en haut) aux stades E7.5, E8.5 et E9.5, telle que suggérée par divers expériences (voir section 1.1.4.2.2.). En bas sont représentés, en rouge, les patrons d'expression confondus de toutes les enzymes qui régulent la synthèse de RA (RALDH 1, 2 et 3; voir sections 1.1.4.1.4. et 1.1.4.2.4.) alors que les enzymes de dégradation de RA sont en bleu, (e.i. CYP26A1, B1 et C1 confondus; voir sections 1.1.4.1.6., 1.1.4.2.4. et 1.1.6.3.1.). On note l'absence de superposition de ces patrons d'expression et la présence de zones contiguës de synthèse et de dégradation de RA.

activité transitoire de RALDH2 dans sa portion postérieure et qui, ici, n'exprime aucune enzyme RALDH connue. Cette activité du rapporteur peut suggérer, entre-autres, qu'en cas de déficience en RALDH2, qui fournit normalement aux somites de l'acide rétinolique qui peut ensuite diffuser jusque dans la plaque neurale, d'autres enzymes inconnues pourraient prendre la relève (Gould et al., 1998; Mic et al., 2002; Niederreither et al., 2002c).

Cependant il faut bien saisir que la présence de régions concentrées en RA juxtaposées à des régions pauvres en RA favorise naturellement une diffusion de RA des premières vers les secondes. Ainsi, les somites adjacents au rhombencéphale sont riches en RALDH 2 et en RA, alors que les rhombomères adjacents expriment des enzymes CYP26. Il fut donc démontré que, localement, RA doit diffuser des somites vers les rhombomères. Ceci fut élégamment démontré entre-autres à l'aide de barrières interposées entre le mésoderme segmenté et les rhombomères et fut ultérieurement confirmé à l'aide d'antagonistes (Dupe and Lumsden, 2001; Gould et al., 1998). L'usage de différentes doses d'antagonistes laissait croire à la nécessité d'un gradient de RA mais cette théorie demeure incertaine. Le fait est que bien que RA diffuse du mésoderme paraxial vers le neurectoderme, cela ne signifie pas pour autant que le gradient ainsi généré soit autre qu'accessoire. Il est probable que d'importer RA du mésoderme paraxial dans les rhombomères tout en y exprimant CYP26 permet un contrôle temporel très serré de l'exposition de ces tissus à RA.

De plus, une étude qui utilisait un filtre implanté entre le mésoderme paraxial et le tube neural ajoute une complexité au système en démontrant que RA devait soit activer, soit être lié à une molécule X qui ne pouvait traverser le filtre (qui pouvait laisser passer RA) pour aller affecter l'identité des rhombomères adjacents (Gould et al., 1998).

1.1.5. Les études de carence en RA.

Certains biologistes considèrent qu'afin qu'une molécule puisse être impliquée dans un processus ontogénique, elle devait répondre à certains critères. Elle devait être disponible au bon moment au bon endroit et causer un phénotype par son absence ou sa surabondance

(Maden et al., 1996). Bien que ce point de vue soit simpliste c'est tout de même dans cet optique qu'après avoir détaillé la biodisponibilité de RA nous exposerons les effets qui résultent soit d'une carence soit d'un excès en RA. Afin de mieux mettre en parallèle les différents phénotypes, les études qui impliquent un blocage de la voie de signalisation des rétinoïdes seront décrites en premier, puis les études qui résultent en une suractivation de cette voie seront à leur tour revues. Les modifications apportées à la signalisation par RA sont réalisées soit *via* une altération de la diète, des récepteurs (effecteurs de la signalisation par RA) des enzymes de synthèse ou des enzymes de dégradation de RA.

1.1.5.1. Les effets d'une carence alimentaire en RA : le syndrome VAD

Bien avant la découverte des récepteurs nucléaires, ou même de l'identification de l'ADN comme véhicule de l'information héréditaire, les biologistes étudiaient les effets de carences ou d'excès en vitamine A. Dès 1925, une publication rapporte les conséquences d'une privation diététique de RA; ce qu'on nomme le syndrome de déficience en vitamine A (VAD) (Wolbach and Howe, 1978). Les rongeurs adultes souffrant d'une carence en vitamine A présentent perte de poids, stérilité, cécité ainsi que des métaplasies squameuses kératinisées ou non d'une myriade d'épithélium. On observe ces métaplasies dans les conduits respiratoires, alimentaire, le système urogénital, les yeux ainsi que les glandes associées à chacun (dont les glandes salivaires, parotides, la prostate, les vésicules séminales, les glandes lacrymales et Harderiennes).

Chez les femelles gestantes, la privation alimentaire de RA entraîne aussi chez les embryons une panoplie de défauts congénitaux qui affectent le cœur et les dérivés des arches aortiques de même que les systèmes respiratoire, urogénitale ainsi que les yeux. On peut renverser tous ces défauts, à l'exception de ceux associés à la vision, par l'administration orale de RA (Wilson 1949, 1948, 1953; Thompson 1964).

Des études similaires ont également été réalisées chez la caille. Des défauts cardiaques et de latéralité ont été observés chez les animaux privés de vitamine A durant leur

développement embryonnaire. De plus, les somites de ces cailles avaient un volume réduit de 75% lorsque comparés aux somites de cailles nourries avec une diète normale. Le rhombencéphale est également affecté par ce manque de vitamine A comme l'indique la présence de seulement 3 rhombomères plutôt que les 8 habituels ainsi que par l'expression anormale de marqueurs pour cette région. Les tissus de la crête neurale sont apoptotiques (Maden et al., 1996; Maden et al., 2000). Les effets VAD semblent donc plus prononcé chez la caille que chez les rongeurs. Ceci probablement due au fait qu'un oeuf de caille VAD ne contient aucun stock de RA qui peut atténuer les effets VAD. Chez le rat, une femelle parfaitement VAD est stérile, donc les embryons de rat présument VAD ne le sont eux même pas complètement.

1.1.5.2. Les effets de l'inactivation de l'enzyme RALDH2

Comme précédemment discuté, l'enzyme RALDH2 catalyse sélectivement la conversion du rétinol en acide rétinoïque. Son inactivation élimine presque complètement l'acide rétinoïque de l'embryon, comme démontré par l'inactivité d'un rapporteur RARE-LacZ introduit dans cette lignée de souris. Le phénotype est létal au niveau embryonnaire; par conséquent il est difficile de le comparer au phénotype des animaux privés de RA si ce n'est la taille réduite des somites et la mauvaise segmentation et expression de marqueurs dans le rhombencéphale (Niederreither et al., 1999; Niederreither et al., 2000) qui rappelle les études décrites plus haut chez la caille.

Au-delà de ces changements précédemment décrits, les mutants RALDH2 démontrent une incapacité à effectuer le retournement qui inverse la courbature lombaire de l'embryon, et démontrent aussi une fermeture incomplète du tube neural, une réduction de la longueur du tronc de l'embryon, l'absence de formation de bourgeons des membres et une morphogénèse cardiaque anormale; le tout consistant avec un arrêt de plusieurs programmes développementaux au stade E8.5 suivi par la mort au stade embryonnaire E10.5. Ces malformations peuvent être prévenues par l'administration maternelle de RA, ce qui confirme le rôle de l'enzyme dans la génération spécifique de RA ainsi que le rôle de

RA dans le développement embryonnaire normal. Ceci n'exclue quand même pas un possible rôle plus tardif de RALDH2 qui serait masqué par cette létalité précoce. Cependant, aucun nouveau phénotype pouvant être associé à une fonction tardive ou autre de RALDH2 ne fut décrit chez les embryons dont le phénotype était corrigé par une administration de RA (Niederreither et al., 1999; Niederreither et al., 2000; Niederreither et al., 2001; Niederreither et al., 2002d). Cependant la correction du phénotype par traitement exogène n'est jamais parfaite et pourrait tout de même masquer certains autres rôles plus tardifs de RALDH2.

1.1.5.3. Les effets de l'inactivation des récepteurs de l'acide rétinoïque

Suite à l'identification des RAR comme récepteurs de RA (Giguere et al., 1987) il devint impératif d'aller au-delà des simples études de carences alimentaires en RA et de bloquer la signalisation par RA en inactivant génétiquement les RAR. Les premières études rapportant les phénotypes associés à la mutation des différents isoformes de RAR α β et γ constituèrent une surprise en ce qu'ils ne présentaient aucune malformations congénitales.

Les souris RAR α 1^{-/-} (abrégié par la suite RAR α 1), RAR γ 2^{-/-} et RAR β ne présentaient pas de phénotype appréciable. Les souris RAR α total (RAR α) ont une viabilité post-natale réduite, un défaut de croissance et une stérilité chez les mâles. De plus certaines malformations congénitales (non-associées au syndrome VAD) sont observables mais à une fréquence très très faible (moins de 5%), notamment des pattes palmées et des malformations de certaines vertèbres cervicales (Lohnes et al., 1994; Lufkin et al., 1993).

RAR γ ^{-/-} présentait aussi une diminution de la viabilité postnatale; une perturbation de la croissance générale ainsi que des métaplasies (caractérisées par la conversion de certains types cellulaires, souvent épithéliaux, en d'autres types cellulaires) des vésicules séminales et de la prostate entraînant la stérilité chez les mâles. Les défauts congénitaux (également absents des animaux privés de vitamine A : voir tableau 1.1.) comprenaient également une fusion des doigts des pattes (à faible pénétrance), des transformations homéotiques et

malformations du squelette axial cervical, la fusion des anneaux cartilagineux de la trachée et l'absence de formation des glandes Hardérienne (glandes lacrimales accessoires) (ce dernier défaut doit être distingué du défaut de maintenance de l'intégrité de l'épithélium glandulaire des mêmes glandes chez les animaux VAD qui présentent des métaplasies squameuses de ce tissu) (Lohnes et al., 1993). Cette absence très spécifique de recoupement entre les phénotypes des simples mutants RAR et ceux des animaux VAD laissait supposer que soit les RAR ne médiaient pas l'action de RA, soit qu'il y avait un haut niveau de redondance entre les RAR et que les récepteurs restants compensaient pour celui qui était muté.

1.1.5.3.1. Récapitulation des défauts VAD chez les mutants RAR/RXR multiples

La présence de multiples récepteurs et isoformes qui furent générés et conservés au cours de l'évolution, ainsi que le patron spécifique d'expression des RAR semblerait invoquer des fonctions distinctes aux différents RAR. Cependant, l'absence de phénotype chez tous les simples mutants RAR, à l'exception de légers phénotypes chez les RAR γ , nous porte plutôt à penser que ces multiples récepteurs ont des fonctions qui sont redondantes entre-elles. Cette hypothèse de redondance de fonction des RAR fut confirmée par la génération de doubles mutants pour les différents isoformes des RAR (voir table 1). L'ensemble des défauts de l'une ou l'autre des combinaisons de mutants RAR récapitulait la totalité des défauts VAD (Kastner et al., 1995; Lohnes et al., 1994; Lohnes et al., 1995; Mendelsohn et al., 1994a). La mutation de RXR α engendre certains phénotypes qui sont amplifiés par la mutation subséquence de RAR α ou γ . RXR α semble être le plus indispensable au développement et le mutant RXR α synergise efficacement avec les différents mutants RAR contrairement aux autres membres des RXR (voir table 1.2.) (Kastner et al., 1997).

1.1.5.3.2. Défauts chez les mutants RAR/RXR non retrouvés chez les animaux VAD

Anomalies congénitales associées au syndrome de déficience en vitamine A (VAD).	Combinaison de mutations de RAR causant une anomalie semblable.	Combinaison de mutations de RAR/RXR causant une anomalie semblable.
Hypoplasie des poumons.	RAR $\alpha\beta$ 2	RAR α RXR α
Absence du septum tracheo-oesophagien .	RAR α 1 β 2; RAR $\alpha\beta$ 2	RAR α RXR α
Myocarde spongieux et amincit.	RAR $\alpha\gamma$;	NA
Fenêtre aortopulmonaire ouverte ; aorte dextropose; défaut des grandes artères aortiques; défaut du septum ventriculaire.	RAR α 1 β 2; RAR $\alpha\beta$ 2; RAR α 1 α 2 ^{+/-} γ ; RAR $\alpha\gamma$	RAR α RXR α ; RAR α ^{+/-} RXR α ; RAR β RXR α ; RAR β ^{+/-} RXR α ; RAR γ RXR α ; RAR γ ^{+/-} RXR α ; RAR β 2 RXR α ; RXR α
Hernie du diaphragme.	RAR $\alpha\beta$ 2	NA
Anomalie de l'uretère. (agenèse et hypoplasie)	RAR α 1 β 2; RAR $\alpha\beta$ 2; RAR $\alpha\gamma$	RAR α RXR α ; RAR α ^{+/-} RXR α ; RAR β RXR α ; RAR β ^{+/-} RXR α ; RAR γ RXR α ; RAR γ ^{+/-} RXR α ; RAR β 2 RXR α ;
Défaut du tractus génital femelle (agenèse partielle ou totale des oviductes et de l'utérus; agenèse du vagin supérieur).	RAR α 1 β 2; RAR $\alpha\beta$ 2; RAR $\alpha\gamma$	NA
Défaut du tractus génital mâle (agenèse ou dysplasie des canaux déférents et vésicules séminales).	RAR α 1 α 2 ^{+/-} γ ; RAR $\alpha\gamma$	NA
Défaut oculaire (colomba de la rétine et du nerf optique, paupières non fusionnées, agenèse de la cornée, malformation du cristallin).	RAR $\alpha\gamma$; RAR β 2 γ	
Rétine ventrale raccourcie.	-	RXR α ; RAR α RXR α ; RAR γ RXR α ;

Table 1.1. Défauts congénitaux retrouvés chez les VAD et les mutants RAR/RXR

Anomalies congénitales absente dans le syndrome de déficience en vitamine A.	Combinaison de mutations de RAR causant une anomalie semblable.	Combinaison de mutations de RAR/RXR causant une anomalie semblable.
Agenèse ou dysplasie des éléments crâniens facial (maxillaire, frontal, nasal).	RAR α γ	RAR γ RXR α ;
Transformations homéotiques ou malformation des vertèbres cervicales	RAR γ ; RAR α 1 γ ; RAR α γ ; RAR α β 2; RAR β γ 2;	RAR γ ^{+/-} RXR α ^{+/-} ; RAR γ RXR α ^{+/-} ; RAR α ^{+/-} RXR α ^{+/-} ; RAR α RXR α ^{+/-} ; RAR β 2RXR α ^{+/-} ;
Défauts de formation des os des membres (malformation de la scapula, agenèse du radius, des os carpiens, syndactylie)	RAR α γ ;	RAR γ RXR α ;
Défaut du cartilage du larynx (malformation, fusion)	RAR α β 2; RAR α γ ;	-
Défaut du thymus (aplasie)	RAR α β 2; RAR α γ ;	RAR β RXR α ; RAR β 2RXR α ;
Défaut de croissance des reins (agenèse ou aplasie)	RAR α γ ;	RAR α RXR α ;
Absence du canal anal	RAR α β 2	-
Exencéphalie	RAR α γ ;	-
Transformations ataviques	RAR α β 2; RAR α γ ;	RAR α RXR α ^{+/-} ;
Hypoplasie des glandes sous mandibulaires	RAR γ ; RAR α 1 γ ; RAR α γ ; RAR β γ 2;	RAR γ RXR α ;

Table 1.2. Défauts congénitaux retrouvés chez les VAD et les mutants RAR/RXR

Au-delà des phénotypes typiques du syndrome de déficience en vitamine A, les mutants multiples pour les RAR/RXR présentent toute une panoplie de défauts congénitaux qui n'ont jamais été observés chez les VAD. Notons principalement les malformations et transformations homéotiques du squelette axial cervical; formation anormale ou absente des structures cranio-faciales, de certains os des membres, défauts du cartilage du larynx, défauts du thymus et plus (voir table 1.2.) revue par (Lohnes et al., 1995) et (Kastner et al., 1995). Notons également la présence de structures morphologiques ataviques (i.e. qui étaient apparentes chez nos ancêtres éloignés et qui ont disparues chez nos contemporains). Ainsi certains piliers osseux et structures cartilagineuses présents à l'intérieur du crâne d'animaux à mi-chemin (évolutionnellement parlant) entre les reptiles et les mammifères ont réapparus chez les souris mutantes pour certaines combinaisons de RAR (Lohnes et al., 1993; Lohnes et al., 1994). Ce qui suppose que c'est à ce moment que fut adoptée la vitamine A dans les programmes développementaux des mammifères, voir même, que l'acide rétinoïque fut en partie responsable de cette transition reptile-mammifère.

Ces phénotypes soulèvent la question à savoir d'où provient l'abondance de malformations chez les mutants RAR non répertoriés chez les animaux VAD. Il est connu que non seulement les embryons complètement VAD ne se rendent pas à terme et meurent à l'état embryonnaire mais la femelle gestante ne survit pas. Ces effets empêchent l'étude d'un modèle parfaitement VAD ce qui peut empêcher l'observation des phénotypes des mutants doubles RAR. Dans ce dernier cas, les parents sont généralement hétérozygotes et ne subissent donc pas les mêmes effets que les femelles VAD. Même alors, 50% des embryons $RAR\alpha\gamma$ mutants se résorbent avant terme et tous les mutants $RALDH2$, qui sont VAD, meurent au stade E10.5 (Niederreither et al., 1999). Considérant que même chez les doubles mutants il reste encore un certain nombre d'allèles RAR encore fonctionnels, c'est peut-être cette redondance partielle qui permet l'apparition de phénotypes intermédiaire entre le VAD et le type sauvage. Une autre explication provient du rôle actif de répresseur joué par les RAR qui ne sont pas associés à leur ligand (Cohen et al., 2000; Koide et al., 2001; Weston et al., 2003), rôle qui est toujours rempli par ces récepteurs dans les

différents modèles VAD mais pas chez les mutants RAR ou les fonctions de répresseurs et d'activateurs sont toutes deux absentes. L'une des façons imaginées pour contourner le problème de redondance fonctionnelle entre les RAR fut de générer des dominants négatifs.

1.1.5.3.3. Défauts chez les RAR dominant négatifs

Les travaux initiaux se basèrent sur une mutation spontanée retrouvée chez des patients résistant aux traitements à l'hormone thyroïdienne. La mutation s'étant produite dans le domaine de liaison du ligand du récepteur (TR), elle empêchait le récepteur d'inverser son rôle de répresseur pour celui d'activateur; entraînant donc la formation d'un récepteur dominant négatif sur la fonction des TR normaux. Ce domaine étant fortement conservé chez les membres des récepteurs nucléaires de type II, une mutation identique fut créée sur RAR α , nommé RAR α E ou RAR-E (Saitou et al., 1994).

Lorsqu'exprimé par transgénèse sous le promoteur de α 1 du collagène type II (spécifique aux cellules chondrogéniques), le RAR-E entraîne un retard dans le développement du squelette ainsi que des transformations homéotiques des vertèbres cervicales (Yamaguchi et al., 1998). Ceci suggérait que la fonction activatrice des RAR était requise pour le développement normal des vertèbres. Cette étude contraste avec une étude *in vitro* où l'expression de *sox9*, considéré comme un régulateur maître de la chondrogenèse, était fortement activée par la présence d'un dominant négatif de RAR γ , réprimant l'action activatrice des RAR. Cette étude suggérait que la répression active par les RAR était nécessaire à la maturation des chondrocytes (Weston et al., 2002). Il demeure fort possible que les RAR doivent jouer les deux rôles, activateurs et répresseurs, mais à des moments différents, afin d'obtenir une bonne prolifération des précurseurs préchondrogéniques et une bonne maturation des chondrocytes.

Chez la grenouille, des dominants négatifs furent utilisés afin de démontrer la nécessité de la signalisation par RA sans laquelle les segments du rhombencéphale subissent une antériorisation (Blumberg et al., 1997; Kolm et al., 1997).

L'usage d'un dominant négatif fut également réalisé dans un contexte de ciblage de gène où le dominant négatif de RAR γ , RAR γ -E(305) (même mutation que le RAR-E), fut inséré à la place de RAR γ 2 endogène (Iulianella and Lohnes, 2002). Les embryons chimériques qui ne survivaient pas jusqu'à terme présentaient souvent des défauts qui rappellent ceux des mutants RALDH2 et présentent un phénotype cardiaque.

1.1.5.3.4. Défauts chez des animaux traités avec un antagoniste des RAR

Finalement, une ultime façon de contourner le problème posé par la redondance fonctionnelle des RAR est d'utiliser un antagoniste chimique qui bloque la fonction d'activation de tous les RAR. L'un de ces antagonistes est le BMS493 (Brystol-Meyer-Squibb, Princeton NJ). Son usage entraîne des défauts de segmentation et d'identité du rhombencéphale du poulet (Dupe and Lumsden, 2001). Chez la souris, il peut causer l'absence d'expression de gènes exprimés de façon asymétrique chez la souris, dont *nodal*, *lefty* et *pitx2*. Ces gènes sont tous trois induits par RA ce qui cause leur expression uniforme bilatéralement. Morphologiquement, les deux types de traitement (RA et BMS493) résultent en une rotation aléatoire du tube cardiaque en plus de défauts aux différentes chambres cardiaques (Chazaud et al., 1999; Wasiak and Lohnes, 1999). Cette méthode permet donc de récapituler une certaine partie des défauts VAD précédemment décrits chez le rat et la caille.

Chez le Xénopus, l'usage d'un autre RAR bloquant, le AGN193109 et l'usage d'un dominant négatif de RAR α et d'un antisens morpholino-RAR, démontraient l'importance de la répression active par RAR pour la formation des structures antérieures de l'animal (Koide et al., 2001).

1.1.6. Les effets d'un excès de RA

Tout comme pour les études d'inhibition de la signalisation de RA, il existe plusieurs outils pour étudier les effets d'une suractivation de la voie des rétinoïdes. L'exposition aux

rétinoïdes exogènes ainsi que les mutants CYP26A1 qui ne peuvent plus dégrader RA seront détaillés dans la section suivante. Les mutations capables de corriger ou prévenir l'effet tératologique de ces excès en RA seront aussi revues.

1.1.6.1.1. L'exposition embryonnaire à RA cause des malformations squelettiques

Les effets d'une carence alimentaire en RA étaient, du moins en partie, connus depuis 1925 (Wolbach and Howe, 1978) et il fut par la suite démontré que la très grande majorité de ces défauts pouvait être renversée par le traitement avec RA (Thompson et al., 1964; Wilson et al., 1953). Depuis, plusieurs études ont démontré que l'exposition d'un embryon à RA exogène entraînait une panoplie d'effets, tant chez la grenouille (Altaba and Jessell, 1991b; Altaba and Jessell, 1991a; Durston et al., 1989), que chez le poulet (Tamarin et al., 1984), ou chez les mammifères comme la souris (Kessel and Gruss, 1991; Kessel, 1992; Shenefelt, 1972; Cohlman, 1953) et l'humain (Lammer et al., 1985).

L'embryon de souris est réfractaire aux traitements exogènes à l'acide rétinoïque avant le jour E7.0; comme l'indique l'absence de défaut congénital suite au traitement antérieur à ce stade (Kessel and Gruss, 1991). Notons tout de même une étude récente décrivant une induction par RA de certains gènes avant E7.0, dont *Hoxb1* à E6.5 et *Cdx1* à E6.0. Pour l'instant aucune donnée morphologique ne confirme ces résultats (Roelen et al., 2002). Le traitement par RA au jour 7.0-7.5 entraîne de profondes malformations craniofaciales, de l'exencéphalie, voire même une troncation de toute la tête à l'exception du bulbe rachidien. Les os crâniens antérieurs sont déformés ou manquants, tout comme ceux de la mâchoire et les os basoccipitaux et exoccipitaux de la base du crâne. Une structure surnuméraire nommée proatlas dérivée du crâne est également générée. Plusieurs transformations homéotiques postérieures sont notées le long du squelette axial de C1 jusqu'à L6. Les côtes sont malformées ou manquantes mais le squelette dans son entier est peu raccourci; un ou deux segments présacrés manquent tout au plus (Kessel and Gruss, 1991).

Le traitement une journée plus tard soit à E8.5 cause plusieurs transformations homéotiques et malformations dont une spectaculaire troncation caudale; survenant au milieu du tronc chez les embryons traités avec 100mg de RA/kg de poids maternelle. Cette troncation a été expliquée moléculairement par la diminution d'expression du gène *brachyury* et celle de *Wnt3A* (Iulianella et al., 1999). Ce phénotype est accompagné de l'absence de fermeture du tube neural caudal qui constitue l'une des formes du *spina bifida* ainsi que des malformations craniofaciales, quoi que moins sévères que celles vues avec les traitements à E7.0.

Ces malformations sont caractérisées au niveau moléculaire par l'antériorisation de l'expression de plusieurs gènes *Hox* (Kessel and Gruss, 1991). Un traitement plus tardif avec RA (au-delà de E10.5) exogène peut également entraîner une respécification de l'identité vertébrale mais sans pour autant altérer le patron d'expression des *Hox* (Kessel, 1992).

1.1.6.1.2. L'exposition embryonnaire à RA cause des malformations du neurectoderme

Ces traitements avec RA exogène entraînent aussi des défauts de segmentation et d'identité des rhombomères chez le poulet (Dupe and Lumsden, 2001). Ce qui concorde parfaitement avec la transformation homéotique postérieure du neurectoderme observée chez la souris lors du traitement avec RA au jour E7.0. Plusieurs marqueurs moléculaires spécifiques aux différents rhombomères indiquaient que les rhombomères 1 à 3 (R1 à 3) prenaient l'identité moléculaire de R4 (Conlon and Rossant, 1992). Similairement une étude publiée la même année rapporte une transformation homéotique des rhombomères 2/3 en 4/5 suite au traitement avec RA à E7.5. de même qu'un défaut des cellules qui vont peupler la première arche branchiale. Ces transformations sont, entre autres, évaluées grâce aux marqueurs spécifiques aux rhombomère *Hoxb1*, *b2* et *Krox20* (Marshall et al., 1992). Chez la grenouille *Xenopus leavis*, un traitement avec RA lors de la neurulation affecte également la taille et la segmentation du rhombencéphale ainsi qu'une altération de l'expression de *XHox3* (Altaba and Jessell, 1991b).

1.1.6.2. La mutation des RAR entraîne une résistance au traitement avec RA

Malgré la redondance des récepteurs, il semble que certains récepteurs soient plus aptes à convoier une réponse tératologique à RA exogène. Ainsi la mutation de RAR γ , au-delà des légers phénotypes engendrés, rendait les embryons résistant contre plusieurs défauts associés avec le traitement à doses tératologiques de RA, dont principalement la sévère troncation lombaire causée par le traitement au jour E8.5 (Lohnes et al., 1993). Dans une étude plus poussée, il a été démontré qu'une partie des défauts du tube neural, des malformations craniofaciales et certaines malformations du squelette axial, induits par un traitement avec RA à E7.3 n'étaient pas présents chez les mutants RAR γ traités. De plus, ces mutants présentaient une forte résistance aux défauts de respécification vertébrale induits par les traitements plus tardifs (E10.5 et 11.5) avec RA (Iulianella and Lohnes, 1997).

Le mutant homozygote RXR α (nul) ne présente aucune anomalie des membres en soit. Pourtant, cette mutation prévient les malformations des membres et des doigts qui surviennent chez tous les embryons de souris de type sauvage traités par RA. Ceci confirme le rôle de RXR α dans la transmission des signaux tératogéniques d'une surabondance de RA dans le membre (Sucov et al., 1995).

Pour ce qui est des défauts du neurectoderme, il a été démontré que l'antériorisation des marqueurs comme *Hoxb4* et *Hoxd4* (de r6/7 à r5/6) n'était plus observée que partiellement chez une proportion de mutants RAR β (Folberg et al., 1999b).

1.1.6.3.1. La mutation de CYP26 entraîne une surabondance de RA chez l'embryon

Deux articles consécutifs ont rapporté le phénotype de la mutation (nulle) de l'enzyme CYP26A1. Cette enzyme qui catabolise la dégradation de RA dans l'embryon en développement est exprimée plus longtemps et dans plus de tissus que les autres enzymes connues de même fonction (MacLean et al., 2001; Tahayato et al., 2003). Comme on

pouvait s'y attendre ces deux études rapportent une panoplie de défauts rappelant ceux du traitement avec RA exogène et, de façon concordante, le rapporteur RARE-hsp-lacZ est actif en surabondance et ectopiquement chez ces mutants (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001). Ces défauts incluaient l'exencéphalie, le spina bifida, la troncation lombaire (entraînant aussi des défauts de formation des intestins, des reins et du tractus urogénital), des transformations homéotiques postérieures du squelette axial, ainsi qu'un défaut de segmentation et d'identité du rhombencéphale rostral. En plus de ces défauts, un phénotype de sirénomélie est apparent. Les membres postérieurs, fusionnés ensemble, causent l'apparence de la queue de sirène. Cette nouvelle modification pourrait être un effet secondaire de la troncation caudale mais n'a jamais été rapporté lors des études de traitements par RA.

Au sujet de la sirénomélie, notons tout de même qu'alors qu'avec les traitements avec RA, tous les tissus reçoivent un excès de RA, chez les mutants CYP26A1, les différents tissus n'accumulent pas RA au même rythme ce qui résulte en des régions plus riches que d'autres en RA. Cette distribution, anormale mais non uniforme, serait susceptible d'entraîner des phénotypes jamais observés par traitement avec RA exogène. Ajoutons aussi que CYP26B1 est aussi présent de façon transitoire à de faibles niveaux dans les parties postérieures de l'embryon (MacLean et al., 2001), ce qui pourrait offrir une protection partielle contre l'excès de RA et permettre le développement de la queue de sirène, comparativement à une troncation caudale chez les animaux de type sauvage traités. Finalement, on ne peut exclure que cette enzyme métaboliserait une autre molécule que RA qui forcément s'accumulerait également chez le mutant et en combinaison à l'excès de RA causerait spécifiquement le phénotype de sirénomélie. Abstraction faite de cette malformation, les membres semblent normaux, ce qui est probablement dû à la présence du second membre de cette famille, CYP26B1, dont le patron d'expression restreint inclut les membres en développement (MacLean et al., 2001).

1.1.6.3.2. Le phénotype CYP26A1^{-/-} peut être corrigé en mutant RAR γ ou RALDH2

En plus de la résistance qu'ils présentent au traitement avec RA exogène, les mutants $RAR\gamma$ démontrent une correction presque complète des phénotypes majeurs des mutants $CYP26A1$. Bien que stériles, (comme les simples mutants $RAR\gamma$), les doubles mutants $RAR\gamma/CYP26A1$ n'ont plus de troncation caudale, ni d'exencéphalie ni de létalité embryonnaire (bien que près de la moitié meurent tôt après la naissance). Ceci confirme mutuellement les rôles essentiels de ces deux régulateurs aux fonctions opposés de la voie de signalisation par RA (Abu-Abed et al., 2003).

Un autre membre important de la voie des rétinoïdes est $RALDH2$, qui a déjà été pointé comme l'enzyme d'importance dans la génération de RA chez l'embryon (Niederreither et al., 1999) comme l'indique la létalité à E10.5 des mutants $RALDH2^{-/-}$. Il est intéressant de noter que la létalité causée par la mutation de $CYP26A1$ peut-être corrigée par la mutation d'un allèle de $RALDH2$. Ainsi, les doubles mutants $CYP26A1^{-/-}RALDH2^{+/-}$ sont, pour la plupart, viables, fertiles et ne présentent que de légères transformations homéotiques ainsi qu'une faible présence de cellules *Hoxb1* positives (correspondant au rhombomère 4) dans le rhombomère 3. Le phénotype léthal de $CYP26A1$ peut être prévenu par la mutation d'un allèle de $RALDH2$ ce qui vraisemblablement ramène les concentrations de RA à des niveaux tolérables pour la plupart des embryons en développement (Niederreither et al., 2002a). De plus, ce croisement mettait un terme aux suppositions selon lesquels les métabolites de RA seraient importants pour la signalisation à RA chez les mammifères. Si des métabolites de RA étaient requis, muter l'enzyme responsable de la synthèse de RA, le précurseur des métabolites, et muter l'enzyme responsable de la dégradation de RA (donc de synthèse des métabolites) auraient eu un effet négatif additif sur la quantité résultante de métabolites. Comme on observe un effet compensatoire et non synergistique, on doit déduire que RA est la molécule active de la voie des rétinoïdes.

En conclusion, deux enzymes principales régulent les niveaux de RA chez l'embryon. Premièrement $RALDH2$, dont semble dépendre la synthèse de RA dans la majorité des tissus embryonnaires où il s'avère nécessaire et deuxièmement $CYP26A1$, qui dégrade RA

dans les tissus où il est indésirable. Ainsi créant des zones concentrées et dépourvues en RA souvent contiguës. Ajoutons que d'autres membres de ces familles sont venus compléter le tableau, soit RALDH3 et CYP26B1 et C1 qui jouent aussi un rôle dans la distribution embryonnaire de RA (Abu-Abed et al., 2001; Haselbeck et al., 1999; MacLean et al., 2001; Niederreither et al., 1999; Sakai et al., 2001; Tahayato et al., 2003). De plus, les RAR s'affichent comme les médiateurs importants et partiellement redondant de la fonction d'activation et de répression de la voie des rétinoïdes (Lohnes et al., 1993; Lohnes et al., 1994; Lufkin et al., 1993; Mendelsohn et al., 1991; Mendelsohn et al., 1994b). Toutes ces études génétiques récapitulent et confirment les rôles de RA dans le développement comme présupposé par les études de gavage et de carence en vitamine A.

1.2.1. Les gènes à boîte Homéo

Comme revue dans les sections ci-haut, un excès de RA, donné oralement à une femelle gestante ou obtenu par mutation des enzymes de dégradation, entraîne une panoplie de malformations congénitales (voir les sous-sections de la section 1.1.6.). Souvent, ces malformations se situent au niveau du patron selon lequel s'organisent les tissus (ou *patterning*) le long de l'axe antéropostérieur. Les différentes unités métamériques le long de l'axe AP, les rhombomères du neurectoderme ou les vertèbres des souris nouveau-nés sont malformés. Il y a plus de dix ans, ces défauts induits par un excès de RA furent associés à un décalage antérieur dans l'expression des gènes *Hox* soit dans le neurectoderme (Conlon and Rossant, 1992) ou dans le mésoderme paraxial (Kessel and Gruss, 1991). Nous verrons donc dans les sections suivantes une définition des gènes *Hox*, leur origine, quand et comment ils sont exprimés et quel est leur lien exact avec le *patterning* antéropostérieur.

1.2.1.1. Les complexes BX-C /ANT-C et les transformations homéotiques

Les études par mutations aléatoires avec un mutagène chimique sont courantes chez la mouche et ont permis l'identification de plusieurs gènes généralement nommés d'après le

phénotype qu'elles entraînent. Ainsi la mutation du gène *wingless* (*Wg*) entraîne l'ablation des ailes (Wilder and Perrimon, 1995) et celle *sevenless* (*Svl*) prévient la formation du septième photorécepteur de l'ommatidie de l'œil de la drosophile (Banerjee et al., 1987). En contraste avec ces altérations morphologiques aberrantes et désordonnées, il existe d'autres mutations qui, elles, résulteront en la transformation d'une structure en une autre. C'est ce que l'on nomme transformation homéotique. Visuellement, l'une des transformations homéotiques la mieux détaillée fut observée chez un mutant de la drosophile où une inversion entraîne l'inactivation du gène *Antennapedia* (*Antp*) causant la formation de pattes au lieu des antennes (Struhl, 1981). Notons aussi *Ultrabithorax* (*Ubx*) dont la mutation peut entraîner la duplication d'un segment thoracique et générer une seconde paire d'aile chez la drosophile, un diptère n'ayant normalement que deux ailes (Lewis, 1978; Merrill et al., 1989). On peut aussi donner comme exemple *labial* (*lab*), qui modifie la structure de la tête de la drosophile, dont la région maxillaire et des vibrisses est déléetée alors que l'arrière de la tête prend une identité thoracique (Merrill et al., 1989). Rapidement, il fut observé que plusieurs des gènes dont la mutation entraînait ce genre de transformation possédaient un domaine conservé de 60 acides aminés, l'homéodomaine, encrypté par 180 paires de bases, la boîte homéo. À noter que réciproquement, la mutation de seulement certains gènes à boîte homéo entraîne ce genre d'altération morphologique. Plusieurs de ces gènes dont la boîte homéo présente une grande homologie à celle de *Antp* sont rassemblés dans deux zones de regroupement (faisceaux ou *clusters*), le complexe *bithorax* (BX-C) et *Antennapedia* (ANT-C) qui, ensemble, forment le complexe homéotique, HOM-C, de *Drosophila melanogaster*.

Chez les mammifères, ces deux loci sont regroupées dans un seul faisceau (provenant d'un faisceau ancestral qui fut scindé chez la mouche), qui est présent en quatre copies, les faisceaux (ou clusters) des gènes *Hox*. Les gènes composant les quatre faisceaux de *Hox* sont dits paralogues les uns aux autres. Ainsi, le long d'un faisceau, le gène qui occupe une position donnée (il existe 13 positions connues) présente une plus forte homologie avec son paralogue, qui occupe une position identique sur un autre faisceau, qu'avec n'importe quel

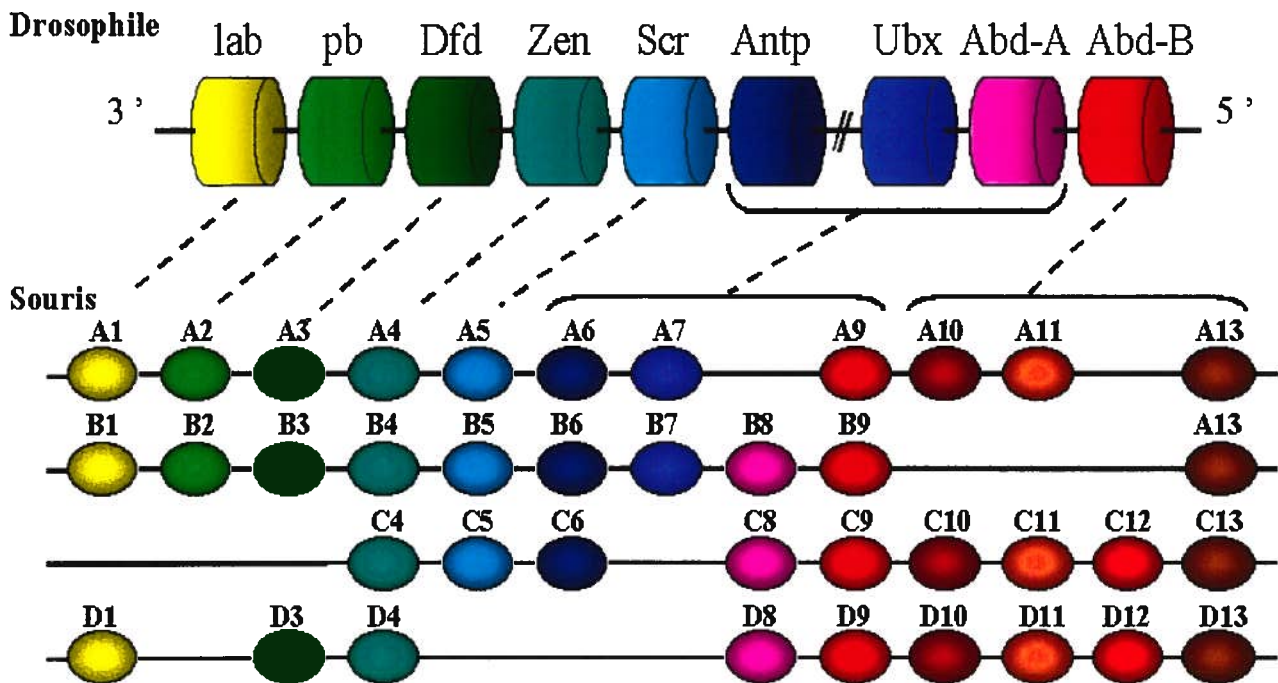
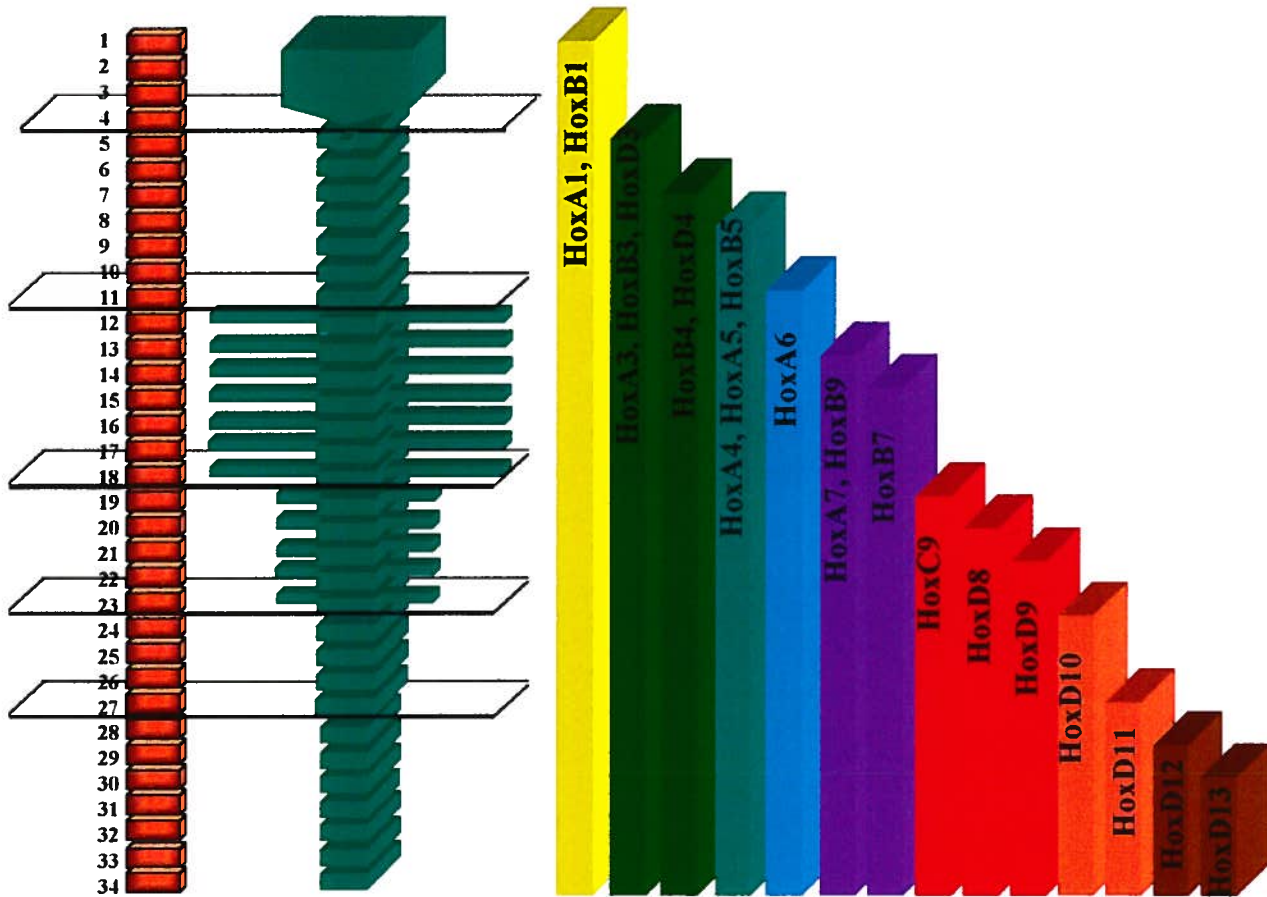


Figure 1.5. Distribution des gènes *Hox* chez la drosophile et chez la souris. On observe la similarité dans la distribution le long de l'ADN des gènes homéotiques entre le faisceau de la *Drosophile* et les faisceaux de gènes *Hox* mammaliens. Notons la duplication de certains membres présents chez la mouche en un exemplaire mais plus nombreux chez la souris, comme Abd-B, qui présente la plus forte homologie aux groupes 10 à 13. Notons aussi que plusieurs positions sont vacantes chez la souris et que seul 39 gènes *Hox* sont présents sur une possibilité de 52, ceci est probablement imputable à des duplications non-homogènes des faisceaux et des gènes qui les constituent. Finalement, rappelons que les membres d'un même groupe (gènes paralogues qui sont d'une même couleur sur le schéma) présentent plus d'homologie entres-eux qu'avec les autres *Hox* situés le long d'un même faisceau.

autre gène le long de son propre faisceau (Mcginnis and Krumlauf, 1992; Sanchez-Herrero et al., 1985; Akam, 1989). La ressemblance de ces *Hox* avec les membres du complexe homéotique correspond également à leur position relative (Mcginnis and Krumlauf, 1992) (voir figure 1.5.).

1.2.1.2. Le principe de colinéarité et le code *Hox*

Les gènes *Hox* sont exprimés selon un ordre précis et de façon graduelle, les membres des groupes les plus 3' en premier (*Hoxa1*, *b1*, etc...) et les groupes situés plus 5' ensuite. De façon concordante, les gènes exprimés en premier vont atteindre des niveaux plus rostraux que les membres exprimés plus tard. Cette expression successive spatiale et temporelle se nomme colinéarité et fut originalement décrite chez la mouche (Lewis, 1978). Ainsi, on retrouve les limites d'expression antérieure des gènes *Hox* le long de l'axe AP dans presque le même ordre que leur position le long des faisceaux (Duboule and Dolle, 1989; Graham et al., 1989). Les gènes *Hox* sont donc exprimés selon des patrons superposés et imbriqués. Ainsi, à un niveau donné le long de l'axe AP correspond l'expression d'un sous-ensemble de gènes *Hox* qui spécifient l'identité du segment en question (voir figure 1.6.). C'est ce que l'on nomme le code *Hox* (Kessel and Gruss, 1991; Kessel, 1992). Une altération de ce patron spécifique pour un segment donné convertira généralement l'identité de ce segment en celle du segment qui normalement possède ce code *Hox* altéré. Ainsi en exprimant des gènes *Hox* plus 5' (i.e. tardifs et de limite plus postérieure), dans des segments antérieurs qui normalement n'expriment pas ces *Hox* 5', on verra ces segments antérieurs prendre l'identité des segments plus postérieurs. C'est ce que l'on nomme transformation homéotique postérieure. L'inactivation génique de certains *Hox* conduira inversement à des transformations antérieures (Horan et al., 1995; Kessel and Gruss, 1991). Les fonctions spécifiques des *Hox* dans le patterning axial seront discutées en détail plus loin.



Somites

Vertèbres

Expression des *Hox*

Figure 1.6. Représentation schématique de l'expression de certains *Hox* le long de l'axe AP chez les mammifères. À gauche on retrouve une représentation des somites, au centre, représenté en vert, les vertèbres auxquelles donneront lieu les différents segments du mésoderme puis à droite, les patrons d'expression des différents *Hox* dans le mésoderme le long de l'axe AP. Cette figure permet donc de voir quels gènes *Hox* doivent être exprimés dans quels somites afin de générer les vertèbres appropriées représentées en vert. C'est une illustration du code *Hox*. Notons que les segments situés antérieurement sont générés en premier au cours du développement et que les *Hox* qu'ils expriment sont les premiers à être exprimés. Ils correspondent aux *Hox* des groupes les plus 3' des faisceaux. De façon progressive, les *Hox* de plus en plus 5' des faisceaux seront à leur tour exprimés.

1.2.1.3. La boîte homéo, structure et fonction

Des études de comparaison de séquences ont permis d'identifier deux régions des gènes *Hox* et des gènes constituant le complexe homéotique (HOM-C) qui sont fortement conservées: l'homéodomaine et l'hexapeptide. L'hexapeptide, IYPWMK, dont le tetrapeptide du centre est hautement conservé, se trouve immédiatement avant l'homéodomaine. La fonction de l'homéodomaine est principalement celle de liaison à l'ADN. Cette fonction fut d'abord inspirée par le riche contenu en acides aminés basiques de l'homéodomaine, soit 30% facilitant les interactions avec l'acide nucléique. De plus, cette séquence présente de fortes homologues avec les motifs hélice α , tour, hélice α déjà connus comme liant l'ADN chez certaines protéines bactériennes (Otting et al., 1988). De plus, ce motif, purifié à partir de l'homéobox de *Antp*, fut démontré par résonance magnétique comme pouvant lier l'ADN. L'homéodomaine est donc constitué de trois hélices α (Scott et al., 1989) dont les deux dernières (C-terminales) d'une longueur de huit et neuf acides aminés respectivement, sont séparées par une boucle de 3 acides aminés et constituent le motif hélice tour hélice. C'est la troisième hélice, dite de reconnaissance, qui permet le contact avec l'ADN (Percival-Smith et al., 1990; Gehring et al., 1990). Les domaines homéo de ces gènes reconnaissent principalement le quadruplet TAAT.

1.2.1.4. Les séquences cibles des protéines HOX/HOM-C et la séquence hexapeptide

Le motif TAAT, est reconnu par pratiquement tous les *Hox* de façon comparable *in vitro* (Mann, 1995; Kalionis and O'Farrell, 1993) et étant fort répandu dans le génome d'autres déterminants doivent conférer la spécificité de liaison des différents *Hox* sur les promoteurs de différents gènes cibles. La protéine à boîte homéo extradenticle (EXD) de la drosophile fut identifiée comme cofacteur des gènes du complexe HOM-C. De plus, ce cofacteur interagit avec la séquence hexapeptide conservée, jusqu'à lors de fonction inconnue chez les gènes homéotiques (Johnson et al., 1995). La structure de ce complexe trimérique Exd-protéine homeotique-ADN fut résolue (Chan and Mann, 1996) et la séquence d'ADN

reconnue fut redéfinie par : TGATTAAT, où le premier quadruplet est reconnu par EXD et le second par la protéine homeotique (LAB dans ce cas-ci). De plus, la mutations des deux premiers nucléotides du second demi-site change la spécificité de cette séquence en une séquence reconnue par *deformed* (Chan et al., 1997) La séquence consensus devrait donc être écrite 5' TGATNNAT.

Transposé chez les mammifères, l'hexapeptide des *Hox* fut démontré comme nécessaire à la liaison à l'ADN des *Hox* en combinaison avec PBX1 ou 2, les homologues murins de EXD (Chang et al., 1995; Neuteboom et al., 1995) qui forment la famille Pbc. Les *Hox* des groupes 1 à 8 possèdent un tel motif hexapeptide alors que les groupes 9 et 10 possèdent un motif ANW. Les *Hox* des groupes 11 à 13 ne possèdent pas un tel motif (similairement à ABD-B) et ne pourront s'associer qu'avec les protéines MEIS (Shen et al., 1997).

La séquence hexapeptide fut réévaluée en détail afin de rationaliser certaines variations observées dans l'habilité des protéines homéotiques à lier certains sites consensus (Chang et al., 1995; Knoepfler et al., 1996; van Dijk et al., 1995). Le dimère PBX-HOX chez les mammifères semble préférer la séquence TGATTAT pour les *Hox* plus 5' et TGATTGAT pour les *Hox* plus 3'. Bien que ces différentes combinaison PBX/HOX lient relativement bien la séquence TGATTAAT *in vitro*, il semble que *in vivo* cette séquence ne soit pas privilégiée (Chang et al., 1996). Notons que cette spécificité de liaison semble être imputable à la première hélice N-terminale du domaine homéo qui reconnaît les nucléotides au cœur de la séquence consensus (Gehring et al., 1994; LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003).

1.2.1.5. MEIS, PBX et autres cofacteurs des HOX

Plusieurs études avaient démontré que l'affinité et la spécificité de liaison des *Hox* sur des sites consensus étaient augmentées grâce à leur interaction avec PBX et/ou un autre facteur, MEIS1 (Chang et al., 1995; Moskow et al., 1995; Neuteboom et al., 1995; Popperl et al., 1995; Shen et al., 1997). Les membres de cette famille, nommée TALE (three amino-

acid loop extension) dont l'homéodomaine atypique contient une extension de trois résidus formant une boucle entre les hélices 1 et 2 de l'homéodomaine, sont *Pbx1, 2* (pre-B acute lymphoid leukemia), *Meis1, 2* (myeloid ecotropic leukemia virus integration site) et *Prep1* (Pbx regulating protein 1) et sont apparentées à la protéine de la drosophile *Exd* (extradenticule) (Berthelsen et al., 1998b; Cecconi et al., 1997; Chan and Mann, 1996; van Dijk et al., 1995). L'hexapeptide des *Hox* contacterait cette boucle dans la formation des dimères *Hox*-TALE. De plus PBX et EXD possèdent une quatrième hélice hors de l'homéodomaine, essentielle à la liaison à l'ADN. Cette quatrième hélice ne contacte pourtant ni l'ADN ni le partenaire *Hox* mais permettrait la stabilisation de la troisième hélice sur l'ADN (Piper et al., 1999).

Alors que le facteur PBX (qui présente une forte homologie avec la protéine de drosophile EXD (Rauskolb et al., 1995)) semble pouvoir s'associer aux HOX des groupes 1 à 10, MEIS1 (qui lui présente une plus forte homologie avec HTH, *Homothorax* (Rieckhof et al., 1997)) semble être préféré par les *Hox* des groupes 9 et 10. Notons aussi que ces facteurs peuvent lier l'ADN comme monomères (Chang et al., 1996; Shen et al., 1997) mais que leur force de liaison à l'ADN est de beaucoup augmentée par leur interaction avec des partenaires *Hox* ou entre eux sur des sites consensus PBX ou HOX-PBX (Berthelsen et al., 1998a; Berthelsen et al., 1998b).

Notons finalement que la régulation de l'activité des *Hox* est complexifiée par la découverte d'associations trimériques entre HOX-PBX et soit MEIS soit PREP1. L'homologue de PBX dans la drosophile, *Exd* requiert l'interaction avec HTH (homologue à MEIS ou PREP) afin de demeurer nucléaire (Abu-Shaar et al., 1999). Des études semblables faite en parallèle dans des cellules de mouche et des cellules de souris ont démontré également que HTH et PREP1 sont requis afin de prévenir l'exportation nucléaire de EXD et PBX (Berthelsen et al., 1999). La stabilité de liaison des hétérodimères MEIS-HOX et PBX-HOX est augmentée par trimérisation avec soit PBX soit MEIS comme partenaire n'interagissant pas avec l'ADN. De façon consistante, le trimère où PBX lie

l'ADN se forme avec les HOX 3', comme démontré pour HOXD4 alors que le trimère où MEIS et non PBX lie l'ADN se forme avec les *Hox* 5' de classe 9 et 10, démontré avec HOXD9 et 10 (Shanmugam et al., 1999). La nécessité de ces interactions tripartites fut aussi confirmée par transgénèse (Ferretti et al., 2000).

1.2.2. Le patterning axial vertébral

La formation de structures répétitives similaires (métamériques) est largement utilisée par l'embryon en développement. Nous aborderons principalement la formation et le patterning des unités métamériques du squelette axial, les vertèbres. Par comparaison, les segments du rhombencéphale seront aussi entrevus ainsi que le rôle qu'y jouent les gènes *Hox*, l'acide rétinoïque et les gènes *Cdx*. Afin de bien comprendre le rôle de ces différents joueurs dans le développement de ces structures métamériques, les sections suivantes résument approximativement la chronologie ontogénique et la morphologie de ces structures.

1.2.2.1. Les vertèbres

Les vertèbres proviennent des cellules du mésoderme paraxial, lui-même formé par les cellules de l'ectoderme primitif qui ont migré à travers la ligne primitive (Christ and Ordahl, 1995; Tam et al., 2000). Ces cellules se retrouvent de chaque côté de l'axe (d'où paraxial) et se condensent et éventuellement se séparent en blocs jumelés, les somites. Ces somites vont éventuellement se différencier en moitiés ventrales (les sclérotomes) et dorsales, les dermamyotomes. Comme leur nom le suggère, les dermamyotomes vont contribuer à la musculature du tronc et des membres ainsi qu'à la peau alors que les sclérotomes vont former les vertèbres, les côtes et l'occiput.

Bien que les somites soient morphologiquement identiques entre-eux, les vertèbres qu'ils formeront auront généralement leur morphologie propre. Les premiers somites à être formés, les plus antérieurs, vont donner naissance aux os occipitaux alors que les suivants seront à l'origine de la colonne vertébrale puis la queue (s'il y a lieu). La colonne vertébrale

se compose chez la souris, de sept vertèbres cervicales (C1-C7), treize thoraciques, ou dorsales (T1-T13), six lombaires (L1-L6), trois ou quatre sacrées (S1-S4) et entre 28 et 32 caudales. Certaines caractéristiques sont fréquemment utilisées afin de définir l'identité des différentes vertèbres. Notons simplement : que C1 la vertèbre la plus antérieure possède des arches neurales très larges, possède un tubercule osseux ventral, l'arche antérieure de l'Atlas (AAA) et C1 ne possède pas de corps vertébral. Celui-ci, lors de sa formation, s'est incorporé à C2, qui possède donc deux corps vertébraux, dont le supérieur sert d'axe pour faire pivoter la tête. C2 possède aussi des arches neurales larges mais moins que ceux de C1. C3 à 5 sont pratiquement impossibles à distinguer sur une base morphologique alors que C6 possède deux tubercules ventraux, les tubercules antérieurs (TA). C7, sauf pour l'absence de foramen transverse est difficile à distinguer de C3-5. Les treize vertèbres suivantes possèdent des côtes dont les sept premières paires sont reliées au sternum. Notons que la seconde vertèbre thoracique possède une épine dorsale proéminente. Certaines vertèbres lombaires et sacrées possèdent d'unique caractéristiques mais dont le détail n'est pas requis ici.

1.2.2.2. Le tube neural et le rhombencéphale

La formation de la plaque neurale se produit lorsqu'une structure tubulaire mésodermale située le long de l'axe AP, la notochorde, envoie des signaux moléculaires au tissu ectodermale sus-jacent. Cette induction neurale entraîne la formation de la plaque neurale qui s'incurvera sur sa longueur pour former la gouttière neurale, laquelle se refermera pour générer le tube neural (Placzek et al., 1990; Yamada et al., 1991). Ce tube neural, dans son extrémité antérieure, s'élargit et se subdivise en trois régions principales, le prosencéphale (le plus antérieur), le mésencéphale (au milieu) et le rhombencéphale (plus postérieur). Cette dernière région se redivise en plusieurs renflements visuellement distincts (les rhombomères) dont les cellules ne se mélangent pas entre-elles et dont les neurones qui en émergeront rejoindront spécifiquement certains nerfs craniaux. L'établissement d'identités distinctes pour les différentes portions du tube neural le long de l'axe AP dépend de

plusieurs signaux moléculaires, dont RA, FGF et Wnt (Altmann and Brivanlou, 2001). Lors de la fermeture du tube neural, les rebords de la gouttière se touchent pour former une nouvelle structure, la crête neurale, propre aux vertébrés et dont une partie des cellules va migrer pour coloniser une panoplie de tissus. Au niveau du rhombencéphale, les cellules de la crête neurale vont migrer ventralement dans les arches branchiales. Ces cellules, qui exprimaient les *Hox* correspondant à leur niveau le long du rhombencéphale, continueront d'exprimer ces gènes, une fois arrivées à destination (Lumsden et al., 1991; Guthrie and Lumsden, 1991).

1.2.3.1 Les gènes hox et le patterning AP

Entre autres fonctions, les *Hox* sont requis pour le patterning (formation du patron des structures en devenir) des segments métamériques le long de l'axe AP. Que l'on s'attarde au tissu neural où le rhombencéphale est divisé en segments, les rhombomères et l'on se rendra vite compte de l'influence des *Hox*. Le patron d'expression de différents *Hox* dans le rhombencéphale correspond à la limite des différentes sections de ce tissu, les rhombomères. Une surexpression des *Hox*, par transgénèse ou suite à l'excès de RA, dans un segment qui ne l'exprime normalement pas, entraîne généralement une transformation homéotique postérieure de ce segment alors qu'une inactivation (ou une carence en RA) entraîne des transformations antérieures (Carpenter et al., 1993; Dupe and Lumsden, 2001; Gale et al., 1999; Marshall et al., 1992). Deux autres exemples très étudiés de la régulation des *Hox* en relation avec le patterning du rhombencéphale sont ceux de *Krox-20* et *Kreisler*. Ces facteurs de transcription à boîte homéo sont nécessaires à la régulation dans les rhombomères 3 et 5 de *Hoxa2*, *b2*, *b3* et de *Hoxa3*, *b3* respectivement (Maconochie et al., 2001; Manzanares et al., 1997; Manzanares et al., 1999; Nonchev et al., 1996), des membres du groupe paralogue 4 sont aussi mal exprimés dans les rhombomères des mutants *Kreisler*.

Au niveau du squelette, les exemples justifiant l'implication des *Hox* dans le patterning vertébral sont nombreux et les exemples d'antériorisation des frontières rostrales

d'expression de plusieurs *Hox* de façon concomitante avec des transformations homéotiques postérieures des segments impliqués sont multiples. Que l'on parle de l'induction ectopique des *Hox* par inactivation des gènes polycombés *bmi-1* et *ring1B* ou *M33* (Alkema et al., 1995; Hanson et al., 1999; Suzuki et al., 2002; Bel-Vialar et al., 2000) , par traitement à l'acide rétinoïque (Kessel and Gruss, 1991) ou chez les souris mutantes pour *Cyp26A1* (Abu-Abed et al., 2001) toutes ces études rapportent des transformations homéotiques dans les segments où les *Hox* sont anormalement surexprimés et supportent la relation intime entre les niveaux d'expression antéropostérieurs des *Hox* et le phénotype vertébral.

Inversement, plusieurs autres modèles illustrent comment les transformations homéotiques antérieures corrént avec un décalage caudal dans l'expression des *Hox* dans le mésoderme. Notons seulement les mutants pour PLZF (Barna et al., 2000), pour *Wnt3a* (Ikeya and Takada, 2001), pour *Gdf11* (*BMP11*) (McPherron et al., 1999) et les mutants pour *Cdx1* et *Cdx2* (van Den Akker E. et al., 2002) qui seront détaillés plus loin et qui supportent cette corrélation. De même, l'inactivation d'un *Hox* ou groupe de *Hox* entraîne généralement des transformations homéotiques antérieures dans les segments correspondant à la limite antérieure d'expression normale des gènes mutés. Les différents paralogues d'un même groupe agissent de façon synergistique sur la fréquence, l'expressivité et l'étendue des malformations (Chen and Capecchi, 1999; Horan et al., 1994; Manley and Capecchi, 1997).

Ainsi, les membres du groupe paralogue 3 sont exprimés dans le tissu précurseur de la première vertèbre qui est mal formée et souvent fusionnée aux os de l'occiput lorsque ces *Hox* sont individuellement mutés. Si plusieurs membres de ce groupe paralogue sont mutés, il y a agenèse de cette vertèbre. Cette observation suggère, entre autres, que l'identité des *Hox* exprimés dans un segment n'est possiblement pas aussi important qu'on aurait pu l'imaginer et que c'est plutôt la quantité totale de gènes *Hox* exprimés dans ce segment qui est critique. Un autre exemple est celui du groupe paralogue 4, impliqué dans la morphogenèse des premières vertèbres. Souvent C2 va prendre l'identité de C1 chez les simples mutants. Lorsque 3 membres sont mutés (*Hoxa4*, *b4* et *d4*) cette transformation

s'étend jusqu'à la quatrième vertèbre qui adoptera des caractéristiques de la première vertèbre, C1. Dans cette dernière situation, le code *Hox* correspondant à C1 s'étend jusqu'au niveau du dixième somite, soit le niveau qui correspondra à la sixième vertèbre cervicale (voire figure 1.6.).

Il est important de préciser que toutes ces malformations osseuses résultant d'un expressions inappropriée des *Hox* laissent présumer qu'ils jouent un rôle dans les programmes développementaux de formation des os. À ce propos, PBX1, partenaire transcriptionnel des HOX, fut impliqué dans le patterning et la régulation de prolifération et de différenciation des chondrocytes. En effet des souris déficientes en *Pbx1* présentent une multitudes de défauts squelettiques axiaux et des membres. En support avec un rôle de PBX dans la chondrogenèse qui dépendent des HOX, plusieurs études d'inactivations de *Hox* ont aussi laissé supposer que la prolifération des progéniteurs chondrogéniques était régulée par les *Hox*, en amont de *Sox-9* (Kanzler et al., 1998; Manley and Capecchi, 1997). De plus, la collaboration HOX/PBX fut démontrée comme essentielle à la régulation tissu-spécifique de la production de collagène V, une autre cible directe des HOX (Penkov et al., 2000). Ces études supportent donc un rôle pour l'action combinée HOX/PBX dans la régulation de la prolifération et différenciation des précurseurs chondrogéniques, avançant ainsi une explication moléculaire aux défauts squelettiques observés suite au dérèglement des *Hox*. Cependant, une dérégulation transitoire des *Hox* bien avant la prolifération/différenciation des cellules chondrogéniques peut mener à des défauts osseux vertébraux (Juan and Ruddle, 2003; Zakany et al., 1997). Afin de réconcilier cette apparente inconsistance, ajoutons que l'activation colinéaire des *Hox* est associée aux cellules ayant un index mitotique élevé, soutenant ainsi une interrelation intime entre la vitesse de croissance des cellules et patterning des tissus (Burke et al., 1995; Duboule, 1994; Morgan and Tabin, 1994). Il est donc possible que les HOX contrôlent dans une certaine mesure la prolifération et ainsi la morphogénèse à adopter par certains tissus.

1.2.3.2. Le code *Hox* et l'établissement de l'identité vertébrale

Le fait que les transformations homéotiques soient une cause de la mauvaise expression des *Hox* ne peut donc pas être réellement remis en question. Cependant on peut se demander à quel moment la morphologie à adopter est déterminée et si la morphologie des différentes vertèbres est déterminée initialement par ces *Hox* et/ou par leur environnement final. Chez le poulet, la transplantation hétérotopique (à un endroit, autre, étranger) unilatérale de somites entraîne la formation de vertèbre chimérique dont le côté greffé ressemble à la vertèbre à laquelle aurait dû donner lieu le somite transplanté. Ainsi une transplantation de somite du tronc dans la région cervicale entraîne la formation ectopique de côtes au niveau cervical du côté opéré et l'opération inverse entraîne l'absence de côte au niveau thoracique du côté opéré (Nowicki and Burke, 2000). Ces résultats sont mis en parallèle avec le maintien de l'expression des gènes *Hox* dans les somites transplantés. Des études plus anciennes rapportent même que la transplantation de mésoderme paraxial présegmenté entraîne des résultats semblables, indiquant que l'information moléculaire pour le patterning des vertèbres est non seulement présent déjà dans les somites mais également dans le mésoderme paraxial au sortir de la ligne primitive, consistant avec l'initiation d'expression des gènes *Hox* (Burke et al., 1995; Gaunt et al., 1986; Gaunt and Strachan, 1996; Kieny et al., 1972; Krumlauf, 1994).

Afin de mieux établir le parallèle entre la détermination de l'identité du mésoderme et l'expression des *Hox*, la section suivante résume brièvement le patron spatio-temporel d'expression des *Hox* le long de l'axe AP de l'embryon de souris.

1.2.3.3. L'expression des gènes *Hox* chez la souris

L'expression des *Hox* se résume par trois phases distinctes, l'initiation, l'établissement et le maintien. L'initiation se produit alors que la ligne primitive est complètement allongée (vers E7.5 chez la souris) de façon coordonnée avec la gastrulation où se forment les nouveaux tissus qui exprimeront ces *Hox*. C'est dans la ligne primitive qu'est initiée l'expression des *Hox*, vers E7.25 pour les membres les plus 3' (i.e. les plus tôt et éventuellement les plus antérieurs) tel *Hoxb1* (Frohman et al., 1990). C'est immédiatement

après l'expression des premiers *Hox* que l'ensemble du faisceau se voit libéré graduellement du mécanisme de répression qui empêchait jusqu'à lors son expression. Cette initiation est susceptible de se faire via l'action de certaines molécules présentes à ce stade dans la ligne primitive comme RA, FGFR1 ou Wnt (Dupe et al., 1997; Ikeya and Takada, 2001; Maden et al., 1998; Pownall et al., 1996; Yamaguchi et al., 1994; Bel-Vialar et al., 2002). Un autre aspect de l'initiation se trouverait au niveau de la compaction de l'ADN et de ses modifications épigénétiques. Ainsi, certains répresseurs se retireraient au moment de l'initiation des *Hox*, rendant le faisceau progressivement accessible de 3' vers 5'. Ce mécanisme expliquerait en partie la colinéarité sans avoir recours à un mécanisme de gradient de morphogène (comme RA), hypothèse du gradient qui n'est plus supportée par aucune évidence à ce jour. Ce mécanisme de dérèpression successive est soutenu par des études récentes où un élément en cis fut découvert à proximité du faisceau D des *Hox* et qui, lorsque muté, entraîne une initiation précoce de l'expression des *Hox* (Deschamps et al., 1999; Kondo and Duboule, 1999). De plus, le knockout de certains gènes répresseurs polycombe, tel M33 entraînait une initiation précoce des *Hox* 5' du faisceau D et rendait les *Hox* de ce faisceau disponibles pour l'activation par RA (Bel-Vialar et al., 2000; Bel et al., 1998; Core et al., 1997). Cette dérèpression prendrait donc place avant que d'autres activateurs en cis jouent leur rôle (Roelen et al., 2002; van Der et al., 1996; van Der Hoeven F. et al., 1996). L'activation des gènes *Hox* plus 5' continue à s'effectuer dans la partie postérieure de l'embryon jusqu'au jour 9.5. Il semble qu'un délai dans l'initiation, même temporaire, soit suffisant pour avoir d'importantes répercussions sur la fonction des *Hox*, comme l'indiquent les transformations homéotiques qui peuvent en résulter (Juan and Ruddle, 2003; Zakany et al., 1997). Ceci suggère que le rôle des *Hox* dans le patterning des cellules mésodermales est critique tôt après qu'elles soient générées. Ainsi ces cellules possèdent l'information positionnelle transmises par les *Hox* bien avant une différenciation morphologiquement visible des tissus qu'elles composent.

Suite à l'étape d'initiation, les domaines d'expression s'étendent antérieurement dans le système nerveux central, le mésoderme paraxial et les lames latérales pour atteindre une

limite antérieure prédéfinie; c'est l'expansion ou établissement. Cette expansion est un mécanisme intrinsèque aux cellules. Une alternative séduisante au modèle obsolète du gradient de morphogène, est celle du temps d'exposition (*timing*). Ce modèle suggère que les cellules qui sortent en premier de la ligne primitive, où les *Hox* sont activés, n'ont eu le temps d'initier l'expression que des membres les plus 3' alors que les cellules qui sortent plus tardivement de cette zone d'induction ont été exposées plus longtemps à des molécules activatrices (comme RA) et ont pu initier l'expression d'un plus grand nombre de *Hox*. Afin de justifier l'expansion d'expression des *Hox* dans des tissus normalement négatifs, il faut supposer que l'ouverture du faisceau des *Hox* se poursuit comme les cellules s'éloignent de la zone d'activation (Charite et al., 1998; Gaunt et al., 1999; Gaunt, 2000; Gaunt, 2001; Gaunt et al., 2003). Nous savons que des mécanismes de régulation croisée et d'autorégulation des *Hox* sont impliqués dans cette phase d'établissement (Packer et al., 1998; Popperl et al., 1995; Wu and Wolgemuth, 1993). Durant cette période le profil d'expression des *Hox* dans le neurectoderme est toujours plastique et susceptible d'être modifié par son environnement, comme le suggère l'interaction entre les somites et le tube neural adjacent (Gould et al., 1998).

Une fois que la limite antérieure d'expression appropriée fut atteinte par les *Hox*, l'implication des gènes *polycombes* et *trithorax* a été démontrée dans le maintien d'expression du complexe HOM-C et ce mécanisme semble conservé chez les vertébrés. Les gènes *polycombes* pourraient donc être impliqués dans l'initiation de l'expression des *Hox* et dans leur phase de maintenance. Les gènes *polycombe* font partie de deux complexes répresseurs distincts, PRC1 (polycomb repressive complex 1) et ESC-E(Z) (Extra Sex Combs et Enhancer of Zeste de la drosophile). Chez les mammifères, on retrouve aussi des homologues pour ces deux complexes. PRC1 contient les gènes *polycombe* Bmi, M33, Mel-18 et Ring1A alors que ESC-E(Z) contient Eed, Enx1 et 2 (Muller and Leutz, 2001; Wang et al., 2002). Le complexe ESC-E(Z) reconnaît des séquences cibles d'ADN. Il condense le locus et le rend inactif via l'activité enzymatique de ses facteurs associés, HDAC1, 2 et le domaine SET de Eed possède une activité

méthyltransférase. PCR1, quant à lui, semble agir via son interaction avec plusieurs nucléosomes ce qui encombre l'accès du complexe de remodelage de la chromatine activateur SWI/SNF (Czermin et al., 2002; Lessard and Sauvageau, 2003; Cao et al., 1996; Muller et al., 2002). Les membres de la famille Trithorax antagonisent l'action des gènes *polycombe* et interagissent positivement avec le complexe SWI/SNF pour rendre l'ADN disponible pour la transcription; le complexe activateur par remodelage de la chromatine *brahma* utilise certains membres trithorax pour cette activation, comme *Osa* et *Moria*. De plus, le membre des homologues mammifères du groupe trithorax, ALL-1 permet l'assemblage d'un super-complexe activateur qui interagit positivement avec TFIID et NURD qui dans ce cas-ci agit comme activateur par remodelage de la chromatine (Muller and Leutz, 2001; Pirrotta, 1997; Poux et al., 2002; Nakamura et al., 2002).

1.2.3.4. La régulation transcriptionnelle des gènes *Hox* par RA chez la souris

Comme suggéré au début de la section 1.2., l'acide rétinoïque affecterait le patterning vertébral en agissant sur les *Hox*. Comme détaillé précédemment, RA est requis dans une myriade de programmes développementaux et son rôle dans le patterning AP fut initialement révélé par les expériences de traitement d'embryon (discuté plus haut) qui altéraient le profil des *Hox* tout en causant des transformations homéotiques vertébrales (Kessel and Gruss, 1991). Comme discuté dans la section 1.1.6. plusieurs études d'excès en RA ont démontré une réponse des *Hox* à RA en culture cellulaire, *in vivo* dans le mésoderme et le neurectoderme (Conlon and Rossant, 1992; Kessel and Gruss, 1991; Simeone et al., 1990). Ces études démontraient une activation séquentielle des *Hox* 3' vers 5'; les membres plus 3' répondant plus rapidement et à des concentrations plus faibles de RA que les membres plus 5'. Cette activation séquentielle supporte bien l'activation colinéaire des gènes le long d'un faisceau *Hox*. Ces résultats établis systématiquement *in vitro* sont supportés par les résultats *in vivo* mais ces derniers sont plus difficiles à contrôler; en effet le temps d'exposition des embryons à RA tout comme la dose effective que chaque embryon reçoit sont dépendants de plusieurs facteurs difficiles à vérifier. Une

analyse comparable à celle effectuées *in vitro* est possible grâce à la culture d'embryon mais ces études sont beaucoup moins exhaustives, du point de vue des concentrations et des temps de traitement utilisés en comparaison aux études *in vitro* plus versatiles (Simeone et al., 1990). De façon concordante, des RARE ont été décrits pour plusieurs gènes *Hox* : *Hoxa1*, *a2*, *b1*, *a4*, *b4*, *d4* (Dupe et al., 1997; Frasch et al., 1995; Huang et al., 2002; Langston et al., 1997; Marshall et al., 1994; Morrison et al., 1996; Packer et al., 1998; Popperl and Featherstone, 1993; Studer et al., 1998; Zhang et al., 2000). Des éléments moins étudiés qui nécessitent toujours confirmation ont aussi été cités dont le RARE servant à *Hoxb5*, *b6* et *b8* et celui de *c8* (Juan and Ruddle, 2003; Oosterveen et al., 2003).

L'excès en RA peut antérioriser l'expression de plusieurs *Hox*, dans le neurectoderme, le mésoderme ou souvent les deux (Allan et al., 2001; Altaba and Jessell, 1991a; Bel-Vialar et al., 2000; Conlon and Rossant, 1992; Dupe and Lumsden, 2001; Folberg et al., 1997; Folberg et al., 1999a; Kessel and Gruss, 1991e; Marshall et al., 1992; Marshall et al., 1996). Pourtant, bien que plusieurs études aient révélé que la présence de RARE dans le promoteur des *Hox* RA inductibles soient requis pour leur expression dans le rhombencéphale (Dupe et al., 1997; Huang et al., 2002; Marshall et al., 1994; Nolte et al., 2003; Oosterveen et al., 2003; Zhang et al., 2000), aucun RARE dont la présence serait nécessaire à une bonne expression des *Hox* dans le mésoderme ne fut à ce jour décrit. Des indices suggèrent que peut être un RARE situé en 5' de *Hoxd4* serait requis pour l'expression mésodermale correcte de ce gène mais une mutation ponctuelle de l'élément est toujours attendue pour en obtenir la confirmation.

Ceci suggère que RA peut agir directement sur ces *Hox* via un mécanisme inconnu et/ou que des intermédiaires relaient le signal des rétinoïdes jusqu'aux *Hox*. Les gènes *Cdx* (1, 2 et 4), les homologues murins de *Cad* (*Caudal*) de la drosophile sont de bons candidats. La fonction de gène sélecteur de *Cad* chez la drosophile, leur relation évolutionnelle avec les *Hox*, leur profil d'expression chez la souris, le phénotype de leur knockout et leur fonction de régulateur des *Hox* en font d'excellents candidats pour jouer le rôle de relais entre la

signalisation par RA et l'expression des *Hox*. Les sections suivantes détailleront ces aspects des gènes *Cdx*.

1.2.4.1. L'isolement du gène *Caudal*

Les membres de la famille *Cdx*, les homologues mammifères du gène de la drosophile *Caudal*, sont des facteurs de transcription qui présentent une certaine ressemblance avec les gènes *Hox*. Le gène de *Drosophila melanogaster* *Caudal* (*Cad*) fut isolé par criblage d'une banque d'ADNc à l'aide de la boîte homéo de *ultrabithorax*. La boîte homéo de *Cad* présente 62% d'homologie avec celle de *Antp* (Levine et al., 1985; Mlodzik and Gehring, 1987). Malgré ces similitudes, *Caudal* ne présente qu'une faible homologie à l'extérieur de cette région et n'est pas lié aux loci des complexes homéotiques BX-C ou ANT-C et n'est par conséquent pas un gène *Hox* proprement dit. *Caudal* est exprimé par le zygote et par la mère (mRNA d'origine maternelle). Il est retrouvé selon un gradient AP entraînant les plus fortes concentration à l'extrémité caudale de l'embryon (d'où son nom) (Macdonald and Struhl, 1986; Mlodzik and Gehring, 1987). Ce gradient est entre autre généré par la protéine Bicoide qui inhibe la traduction de *Cdx1* dans la portion antérieure de l'embryon en liant le 3'UTR de son ARNm (Niessing et al., 1999; Rivera-Pomar et al., 1996).

Les produits des gènes du complexe HOM-C de la drosophile sont souvent qualifiés de gènes sélecteurs et servent à spécifier l'identité des différents segments le long de l'axe AP et il semblerait que *Cad* puisse jouer un rôle semblable (Bienz, 1994; Mann, 1995; Mann and Morata, 2000). Il est intéressant de noter que le segment le plus postérieur (A10), destiné à générer les structures anales de la drosophile n'exprime aucun membre du complexe HOM-C, dont l'expression du membre le plus postérieur, *Abdominal-B* (*Adb*), se termine dans l'avant dernier segment (A9) (Calleja et al., 1996). Cependant, le segment A10 exprime fortement *Cad*. De façon consistante avec ce qui est observé avec les gènes HOM-C (Mcginnis, 1994), la mutation de *Cad* entraîne la transformation homéotique du segment 10 en segment 9 (Macdonald and Struhl, 1986; Moreno and Morata, 1999). Inversement, l'expression ectopique de *Cad* dans les régions antérieures entraîne des

transformations homéotiques postérieures. Lorsque ciblé dans le segment le plus antérieur, *Cad* génère même la formation de structures anales dans la tête (Mlodzik et al., 1990; Moreno and Morata, 1999). Ces études suggèrent que *Cad*, bien que non lié au complexe HOM-C, possède une fonction et une structure semblable aux produits des gènes *Hox*.

1.2.4.2. Les complexes *protoHox/paraHox*

La similarité structure fonction de *Cad* et *Hox* suggère qu'ils pourraient bien provenir d'un faisceau ancestral commun. Une telle supposition est tout d'abord supportée par la présence d'un faisceau, identifié chez *Amphioxus*, constitué de *AmphiCdx*, *AmphiXlox* (*pdx* chez les mammifères) et *AmphiGsx* (*Gsh* chez la souris) qui démontre des propriétés de colinéarité (Brooke et al., 1998). De plus, la similarité entre les *paraHox* et les *Hox* est consistante avec la supposition qu'un groupe plus ancien nommé *protoHox* aurait donné naissance au cours de l'évolution au complexe HOM-C de la drosophile, les faisceaux *Hox* et *paraHox* (Ferrier and Holland, 2001; Pollard and Holland, 2000). Cette origine commune expliquerait en partie les fonctions et structures communes des *Hox* et de *Cad*; certaines études conjecturent que *Cad* serait le paralogue du faisceau *paraHox* qui correspondrait à *AbdB* du complexe HOM-C ou à *Evx1* et *2*, gènes associés à la région 3' des faisceaux *Hoxa* et *Hoxd* (Bastian and Gruss, 1990; Brooke et al., 1998; D'Esposito et al., 1991). Notons finalement qu'en se basant sur la similitude des séquences de l'homéodomaine et de l'hexapeptide, *Cdx1* et *2* sont davantage associés aux *Hox* des groupes paralogues 8 et 9 (van Den Akker E. et al., 2002).

1.2.4.3. Les gènes *Cdx* et le patterning vertébral

La répression traductionnelle de *Caudal* par *Bicoide* dans les régions antérieures de l'embryon de la drosophile (Rivera-Pomar et al., 1996) est essentielle au bon développement des structures antérieures qui sont mal formées chez l'embryon surexprimant *Cad* de façon ubiquitaire (Mlodzik et al., 1990). Inversement, la délétion de ce gène entraîne la délétion et la malformation des segments les plus postérieurs

(Macdonald and Struhl, 1986; Rivera-Pomar et al., 1995). De plus, comme mentionné plus haut, une expression ectopique de *Cad* dans la tête ou l'aile génère la formation ectopique de structures anales dans ces tissus (Moreno and Morata, 1999). Ces différentes observations suggèrent que *Cad* a deux fonctions séparées chez la mouche, soit de permettre le bon patterning et la segmentation de l'embryon le long de l'axe AP et également de diriger la formation des structures les plus postérieures.

1.2.4.4. L'expression des gènes *Cdx* chez la souris

Afin de mieux juger des relations possibles entre les différents facteurs *Hox*, RA et *Cdx* il est important de présenter, pour commencer, le patron d'expression des différents *Cdx*. En comparant ces profils d'expression à ceux des *Hox* et au profil de biodisponibilité de RA, nous serons en mesure de mieux interpréter les phénotypes et altérations d'expression de gènes *Hox* dans les modèles knockout pour les différents *Cdx*.

1.2.4.4.1. l'expression de *Cdx1*

Le gène *Cdx1* se trouve sur le chromosome 18 de la souris (Duprey et al., 1988). Ses transcrits sont tout d'abord détectés dans le sac vitellin au début de la gastrulation (McGrath and Palis, 1997). Au jour embryonnaire E7.5, ils sont trouvés dans l'ectoderme puis dans le mésoderme naissant dans la région élargie de la ligne primitive (Meyer and Gruss, 1993). Peu après, à E7.75, *Cdx1* peut être détecté antérieurement au nœud dans la plaque neurale et le mésoderme paraxial nouvellement formé. À E8.5, on retrouve *Cdx1* dans le tube neural, les somites et le bourgeon de la queue. La limite rostrale d'expression de *Cdx1* à ce stade est le sulcus préoptique (région qui va générer l'œil) dans la région de l'ectoderme neural qui deviendra le rhombencéphale postérieur, cette limite d'expression est légèrement plus postérieure dans le mésoderme. Au cours du développement, la limite antérieure d'expression de *Cdx1* dans le tube neural régresse postérieurement. *Cdx1* est également trouvé dans certaines cellules migratoires de la crête neurale. *Cdx1* est exprimé dans les dermamyotomes. À E10.5, l'expression est plus évidente pour les 16 premières

paires de somites générées et est difficile à observer plus postérieurement à l'exception des somites 24 à 30 qui sont au niveau du bourgeon du membre postérieur et qui expriment *Cdx1* fortement. L'expression de *Cdx1* est toujours observable dans le bourgeon de la queue et le mésenchyme des bourgeons des membres. Elle est aussi détectée dans le cordon néphrogénique et plus tard dans les canaux mésonéphriques. Cette expression diminue graduellement jusqu'au jour E12.0 où elle n'est plus détectée. Vers E14.0 *Cdx1* devient exprimé dans l'endoderme des intestins avec une limite antérieure correspondant au duodénum en formation alors que postérieurement il s'étend jusqu'au colon distal, où il atteint un maximum d'expression, selon un gradient antéropostérieur (Duprey et al., 1988a; James et al., 1994). Cette expression est maintenue dans le tractus intestinal où le messenger et le produit de *Cdx1* sont retrouvés dans les cellules des cryptes chez l'adulte (James and Kazenwadel, 1991; Subramanian et al., 1995).

1.2.4.4.2. l'expression de *Cdx2*

Cdx2 se trouve sur le chromosome 5 de la souris et possède un profil d'expression qui débute au jour E3.5 dans les cellules du trophoctoderme. Cette expression se poursuit dans le placenta au moins jusqu'au jour E12.5 (Beck et al., 1995; Chawengsaksophak and Beck, 1996). L'initiation de l'expression de *Cdx2* dans l'embryon en tant que telle débute après celle de *Cdx1*, soit au jour E8.5 dans la région postérieure de l'embryon dans tous les tissus des vestiges de la ligne primitive et à la base de l'allantois. À ce stade, *Cdx2* est aussi observé dans la région postérieure de la plaque neurale et de la notochorde ainsi que dans l'endoderme intestinal et dans le mésoderme paraxial non segmenté. Plus tard, l'expression de *Cdx2* est maintenue dans le bourgeon de la queue et à E12.5 est localisée dans la partie la plus postérieure de l'embryon et dans l'endoderme intestinal avec une limite correspondant à l'intestin embryonnaire médian. Dans les intestins, ce niveaux d'expression diminue selon un gradient pour devenir indétectable dans la région du colon distal. Comme pour *Cdx1*, l'expression de *Cdx2* est maintenue dans l'endoderme du colon et des intestins chez l'adulte, dans les cellules des cryptes. Par contre, on le trouve également dans les

cellules en différenciation qui migrent hors des cryptes (Duluc et al., 1997; Freund et al., 1992). Notons que chez l'adulte, les niveaux de *Cdx1* et 2 dans le colon et l'intestin suivent des gradients inverses de concentration, *Cdx1* étant plus concentré distalement et *Cdx2* proximale. De plus *Cdx2* est aussi trouvé dans le pancréas, où il régulerait l'expression des gènes du glucagon et de l'insuline (German et al., 1992; Jin and Drucker, 1996).

1.2.4.4.3. l'expression de *Cdx4*

Cdx4 est situé sur le chromosome X (Horn and Ashworth, 1995). Son patron d'expression est plus restreint que celui de *Cdx1* et de *Cdx2*. De faibles niveaux sont d'abord détectés dans l'allantois puis à l'extrémité postérieure de la ligne primitive à E7.5. Lors de la neurulation, on le retrouve dans tous les tissus de la ligne primitive dans un gradient de concentration qui augmente jusqu'à l'extrémité postérieure de l'embryon. On le trouve aussi dans le mésoderme paraxial jusqu'au niveau postérieur au dernier somite formé et dans le neurectoderme légèrement plus antérieur. Notons tout de même qu'une frontière antérieure n'est bien définie ni dans un tissu ni dans l'autre. *Cdx4* est aussi exprimé de E8.5 à 9.5 dans les lames latérales, le mésoderme intermédiaire et l'endoderme intestinal postérieur (Gamer and Wright, 1993). Son expression n'est plus détectée après E10.5 mais les données chez l'adulte sont limitées.

Chez le poulet, une analyse comparative fut faite pour les trois homologues des gènes *Cdx*. Ces résultats montrent de fortes similarités avec ce qui fut observé chez la souris. L'homologue de *Cdx1* est exprimé antérieurement aux deux autres dans la ligne primitive et dans le mésoderme dans un patron imbriqué. Lors de la régression postérieure d'expression, *CdxA* (homologue de *Cdx1* chez le poulet) disparaît en premier, puis suivant l'ordre inverse de leur apparition (Marom et al., 1997).

En résumé, disons que les gènes *Cdx* sont exprimés de façon imbriquée dans la ligne primitive. Leur profil d'expression spatial et temporel, qui se superpose avec la zone d'activation de *Hox*, de même que l'identification de certains *Hox* parmi les cibles des

membres CDX en font d'excellents candidats faisant partie d'un mécanisme plus général de régulation des *Hox* et par conséquent du patterning vertébral.

Des études chez la grenouille suggéraient déjà un lien entre le patterning du mésoderme, les *Hox* et *Cdx*. En effet, l'injection d'un dominant négatif FGFR inhibe l'expression de *Xcad3* (homologue de *Cdx4*) et entraînent des défauts d'expression de marqueurs du mésoderme dont des gènes *Hox*. Ces études furent confirmées et approfondies à l'aide d'injection de *Xcad3* ou de dominants (négatifs ou constitutivement actifs) caractérisant des phénotypes sévères par l'expression de différents marqueurs *Hox* (Isaacs et al., 1998; Northrop and Kimelman, 1994; Pownall et al., 1996). Ces études fournissaient le premier lien entre les *Cdx* et les *Hox*. Les études par inactivation génique des *Cdx* chez la souris sont venues plus tard mais leur profils d'expression furent analysés il y a déjà quinze ans et semblaient supporter une interaction possible entre *Cdx*, *Hox*, RA et le patterning vertébral. Nous aborderons donc la description des phénotypes qui résultent des knockout de l'un ou l'autre de ces gènes.

1.2.4.5.1. L'inactivation de *Cdx1* et le patterning AP

Il semble que la fonction de *Cad* sur le patterning AP soit conservée chez ses homologues murins *Cdx*. Les souris *Cdx1* nulles sont viables et fertiles et semblent phénotypiquement normales. Leur squelette axial a cependant subit une série de transformations homéotiques, dont plusieurs sont toujours observables, à un degré moins sévère, chez les souris *Cdx1* hétérozygote (*Cdx1*^{+/-}) (Allan et al., 2001; Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002) indiquant que le niveau protéique de CDX1 est très important pour ses fonctions (haploinsuffisance). Les transformations homéotiques observées sont surtout situées au niveau cervical où elles sont très pénétrantes. Notons que ce sont toutes des transformations homéotiques antérieures, ce qui est consistant avec le décalage postérieur de l'expression de certains gènes *Hox* dans le mésoderme. En effet, l'identité plus postérieure des segments plus caudaux du mésoderme est due aux *Hox* de plus en plus 5' qui y sont exprimés. Sans ces derniers, les segments adoptent, à défaut, une identité antérieure. Le retrait de ces *Hox*

plus 5' de certains segments leur confère à défaut, un destin plus antérieur que prévu, d'où les transformations homéotiques antérieures chez les mutants *Cdx1*. Bien que *Cdx1* soit normalement exprimé dans le bourgeon des membres, les dermamyotomes, le mésonéphros et le tractus intestinal, aucune anomalie de ces tissus ne fut rapportée. Le détail des anomalies squelettiques de ces mutants est revu dans les articles des chapitres 2 et 3 de la présente thèse.

1.2.4.5.2. L'inactivation de *Cdx2* et le patterning AP

Les mutants nuls pour *Cdx2* quant à eux, ne survivent pas à l'implantation et périssent au jour embryonnaire E3.5. Cette létalité péri-implantation est possiblement due à des défauts du trophoctoderme, où *Cdx2* est normalement exprimé (Beck et al., 1995; Chawengsaksophak et al., 1997). Les hétérozygotes pour *Cdx2*, présentent des transformations homéotiques antérieures de la colonne vertébrale, plus particulièrement de la région cervicale basse et thoracique haute. Ces anomalies récapitulent certains défauts des mutants *Cdx1* mais s'étendent plus postérieurement, ce qui reflète possiblement l'effet de l'expression plus tardive de *Cdx2* vs *Cdx1* dans le mésoderme, affectant donc les tissus formés plus tardivement. De plus, ces souris ont une queue raccourcie, un défaut qui n'est pas à date expliqué et relève probablement d'un mécanisme différent de celui causant les transformations homéotiques. Notons que ce raccourcissement n'est pas observé chez les mutants *Cdx1* mais que les doubles mutant *Cdx1*^{-/-}*Cdx2*^{+/-} ont une queue encore plus courte que les *Cdx2*, révélant un rôle possible de *Cdx1* dans ce mécanisme (Chawengsaksophak et al., 1997; van Den Akker E. et al., 2002) qui pourrait s'apparenter à la spécification des segments postérieurs comme observé chez la drosophile (Moreno and Morata, 1999).

Les souris hétérozygotes *Cdx2* ont aussi des lésions dans le colon proximal qui ressemblent à des polypes. Ces lésions consistent en des zones d'épithélium squameux stratifié, normalement retrouvé dans l'œsophage et l'estomac proximal. Notons qu'à la jonction entre ces zones de tissu oesophagien et le tissu normal du colon proximal, on retrouve toute la succession de tissus que l'on retrouverait normalement entre l'œsophage et le colon, soit

stomacal et intestinal. Ce phénomène se nomme régénération intercalaire. Notons aussi que les cellules de ces lésions n'expriment pas *Cdx2*, bien que la souris soit hétérozygote pour ce gène. De façon consistante, le tissu de l'œsophage normal n'exprime pas non plus *Cdx2*. On retrouve des niveaux sans cesse croissants à mesure qu'on s'éloigne du centre de ces lésions pour atteindre des niveaux élevés dans le tissu du colon proximal (la région du tractus qui normalement exprime *Cdx2* le plus fortement). Finalement, on doit indiquer que la perte d'expression de *Cdx2* au cœur de ces lésions ne résulte pas d'une perte d'hétérozygotie mais plutôt d'un autre mécanisme, possiblement épigénétiques qui entraîne une perte d'autorégulation (Beck et al., 1999; Chawengsaksophak et al., 1997).

Cette situation dans son ensemble semble indiquer que *Cdx2* encode l'information nécessaire à la « caudalisation » de l'endoderme de l'intestin en une identité de tissu de colon proximal et qu'en l'absence de cette instruction, l'endoderme adopte à défaut une identité plus rostrale (l'œsophage). Cette situation démontre donc un autre niveau de contrôle du patterning AP de l'embryon par *Cdx*, car les transformations homéotiques en plus d'affecter le squelette, affectent les tissus dérivés de l'endoderme comme l'inactivation de certains *Hox* l'a révélé possible (Aubin et al., 2002; Aubin et al., 1999).

1.2.4.5.3. L'inactivation de *Cdx4* et le patterning AP

L'inactivation génique de *Cdx4* n'a pas été décrite jusqu'à présent. Comme *Cdx4* est situé sur le chromosome X et est lié au centre d'inactivation du chromosome X (*Xic*) chez la souris et l'humain il est fort probable que son inactivation génique entraîne des problèmes au niveau de la contribution de cellules souches *Cdx4* mutantes à la souris chimérique, aux cellules germinales de la souris chimérique résultante ou limite la viabilité de cette dernière (Horn and Ashworth, 1995). Notons cependant qu'une récente publication identifie tout d'abord *Cdx4* comme le gène muté chez le mutant d'un crible avec l'ENU, *kugelig* (*kgg*) du poisson zèbre *Danio rerio*. *Kgg* est un mutant isolé d'après un défaut de formation de la queue et subséquentement étudié pour ses défauts d'hématopoïèse (défaut des précurseurs érythroïdes qui mène à l'anémie) (Davidson et al., 2003; Hammerschmidt et al., 1996). La

mutation identifiée n'entraîne qu'une mutation ponctuelle dans la protéine mais elle est suffisante pour empêcher cette forme mutée de *Cdx4* de lier l'ADN. Il n'est pas clair présentement si ce mutant peut agir comme dominant négatif pour des cofacteurs ou s'il agit simplement comme un mutant nul. Cependant un autre allèle mutant de *Kgg*, mais où le locus est délété, fut aussi identifié avec des conséquences semblables. Ces mutants présentaient aussi des défauts d'expression des gènes *Hox*, dont 5 membres du faisceau B dont l'expression dans le mésoderme était étendue et *Hoxb6* et *a9* dont l'expression avait disparu du mésoderme. Cette étude rapporte aussi la création de cellules souches murines surexprimant *Cdx4* et agrégées en corps embryoïdes qui généraient de 11 à 13 fois plus de précurseurs hématopoïétiques lorsque comparées aux lignées contrôles. Ces cellules souches présentaient une augmentation drastique des niveaux d'expression de différents *Hox* étudiés (une étude qui ciblait surtout le faisceau B).

Il reste difficile d'extrapoler à partir d'un mutant ponctuel, dans le système du poisson zèbre ou à partir de cellules souches surexprimant *Cdx4*, la fonction de ce gène dans le patterning AP, mais la troncation caudale associée à ce mutant, de même que la modification du patron des gènes *Hox* dans le mésoderme du *Danio rerio* nous porte à croire qu'il a un rôle à y jouer qui demeure à être élucidé. Ajoutons que l'altération de la fonction de *Xcad3* l'homologue de *Cdx4* chez le *Xenopus* entraîne des effets dévastateurs chez la grenouille. En effet, une surexpression d'une forme activée de *Xcad3* inhibe le développement des structures antérieures alors que l'injection d'un dominant négatif *Xcad3* cause la perte des structures du tronc et de la queue (Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1996). En plus, une surexpression par transgénèse de *Cdx4* chez la souris entraîne l'expansion antérieure de l'expression de *Hoxb8*, ce qui consolide encore le lien probable entre *Cdx4*, les gènes *Hox* le patterning AP (Charite et al., 1998).

1.2.4.6. La régulation des *Hox* par *Cdx*

Ces différentes études décrivent les gènes *Cdx* comme des régulateurs de l'expression des *Hox*. Il est intéressant de constater que les transformations homéotiques observées chez les

mutants *Cdx1* (et *Cdx2*) sont presque des phénocopies (de phénotype identique) de mutants pour certains *Hox* (voir table 2.3.). De façon correspondante, l'expression de certains gènes *Hox* est postériorisée dans les somites des mutants *Cdx1* et *Cdx1/Cdx2*. Typiquement cette postériorisation d'expression des *Hox* est d'un seul somite, ce qui apparaît suffisant pour induire un phénotype semblable au mutant nul de ces mêmes *Hox* (Allan et al., 2001; Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002). Ainsi l'expression des *Hox a3*, *b3*, *d3* et *b4*, *d4* est postériorisée d'un segment chez les mutants *Cdx1*, comme rapporté précédemment (Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002) et détaillé dans le chapitre 3. Un rôle pour *Cdx* dans l'établissement de l'expression des gènes *Hox* est aussi supporté par les profils d'expression spatio-temporels des *Hox* et des *Cdx* (voir sections 1.2.3.3. et 1.2.4.4.). Sachant que les cellules mésodermes sont informées du sous-groupe de *Hox* qu'elles doivent exprimer au sortir (voir section 2.2.2.2.) de la ligne primitive la régulation des *Hox* par les *Cdx* doit s'effectuer dans la ligne primitive (ou ses vestiges). En support de ce modèle, notons que l'expression de *Hoxb8* est postériorisée chez les mutants *Cdx1-Cdx2* et ne peut atteindre sa limite antérieure normale au jour E9.0. Cependant, à ce stade, les *Cdx(1-2)* ne sont pas exprimés aussi rostralement que *Hoxb8*, suggérant que l'information de *Cdx* à *Hox* fut transmise avant ce stade (van Den Akker E. et al., 2002).

Ce rôle des *Cdx* dans la régulation des *Hox* semble être conservé à travers les espèces. Ainsi, chez la grenouille, un dominant *Xcad3* (*Cdx4*) supprime l'expression de *Hoxc6*, *a7* et *b9*. L'injection de *Xcad3* sauvage ou suractivé entraîne une surexpression de ces mêmes *Hox* (Isaacs et al., 1998; Isaacs et al., 1999). Similairement, chez le poulet, *Hoxa7*, *c6* et *c8* sont activés par *Cdx-B* (homologue à *Cdx4*) (Ehrman and Yutzey, 2001). Même chez le vers *C.elegans*, l'homologue de *Cdx*, *Pal-1* fut démontré être en amont de *mab-5*, un gène *Hox* (Hunter et al., 1999).

1.2.4.7. La régulation transcriptionnelle par les CDX

Afin de mieux comprendre comment les facteurs de transcription CDX peuvent réguler l'expression des *Hox*, nous ferons un survol des cibles connues des CDX ainsi que des

mécanismes d'activation identifiés. Ces facteurs de transcription, comme mentionné précédemment, possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type boîte homéo. Ils possèdent aussi, tout comme les *Hox*, une séquence hexapeptide et une séquence N-terminale nécessaire lors de leur passage à travers le réticulum endoplasmique.

Le premier gène cible de *Caudal* identifié est *Fushi Tarazu (Ftz)*, un membre des gènes paire (pair-rule gene). Le promoteur de *Ftz* contient deux éléments de réponse à caudal, les CDRE (*Caudal* response elements), arrangés comme une répétition inversée (palindromique) de la séquence TTTATG. Ces éléments sont essentiels pour qu'un transgène rapporteur récapitule l'expression normale de *Ftz* (Dearolf et al., 1989). Une séquence consensus pour Cdx-A, (l'homologue de *Cdx1* chez le poulet), fut définie à partir d'une population (banque) d'oligonucléotides comme étant A/CTTTATA/G (Margalit et al., 1993). Cette séquence permet à un promoteur basal de répondre à la présence de CAD et englobe les éléments identifiés pour *Ftz*. Depuis, plusieurs sites ont été identifiés, dans le promoteur de gènes de différentes espèces qu'on peut classer dans deux catégories principales. Les gènes à boîte homéo : chez la souris, *Hoxa7*, *Hoxb8*, *Cdx2* et chez la mouche *Ftz* (Charite et al., 1998; Dearolf et al., 1989; Subramanian et al., 1995; Xu et al., 1999), et les gènes impliqués dans le métabolisme dans les intestins et le pancréas : chez le hamster *insulin I*, chez la souris *proglucagon*, *lactase-phorizin* chez le porc, chez l'humain *carbonic anhydrase* et chez le lapin, *phospholipase A* (Drummond et al., 1996; German et al., 1994; Jin et al., 1997; Mitchelmore et al., 2000; Suh et al., 1994; Taylor et al., 1997a). Plusieurs autres gènes répondent à *Caudal* mais les sites sont inconnus ou encore possèdent des CDRE dans leur régions non-codantes qui n'ont pas encore été démontrés comme fonctionnels. Parmi les gènes dont le patron d'expression normal dépend des *Cdx*, notons : *Hox a3, b3, d3, b4, d4, c5, c6, c8* (Subramanian et al., 1995; Allan et al., 2001; Charite et al., 1998; van Den Akker E. et al., 2002).

Le motif hexapeptide des HOX sert, entre autres, à leur interaction avec les membres *Pbc* (Mann and Affolter, 1998). Pourtant, malgré sa conservation chez les membres *Cdx*, aucune

interaction PBX-CDX ne fut décrite. De plus, aucun site de liaison pour PBX juxtaposé à un site de liaison par CDX ne fut rapporté. La question à savoir si ce motif n'est qu'un vestige conservé d'un gène *protoHox* ancestral ou s'il sert à l'interaction avec d'autres cofacteurs non-identifiés reste entière. Il est tout de même important de mentionner que le facteur de transcription hépatique à boîte homéo de la famille forkhead HNF-1 α peut lier des éléments de réponse mixtes à CDX et HNF-1 α . Par exemple, le promoteur de la *lactaze-phlorizin* porcine contient deux éléments de réponses à CDX flanquant un élément de liaison de HNF-1 et la présence de ces deux facteurs active de façon synergistique ce promoteur (Mitchelmore et al., 2000). De plus, cette étude montrait que ces deux protéines interagissaient *via* leur boîte homéo respective. Un autre exemple est celui du promoteur de la protéine *Claudin-2*, un élément des jonctions cellulaires serrées (tight junctions) de l'intestin, du foie et des reins. Ce promoteur aussi contient un double élément de réponse à CDX, précédé d'un élément de liaison pour HNF-1 α (Sakaguchi et al., 2002).

Nous ne savons que peu de chose des mécanismes exactes de l'activation de gènes cibles par les *Cdx*, cependant, des essais de transcription dans des cellules ont mis en évidence l'importance des 180 acides aminés en N-terminale du domaine homéo de *Caudal* pour la transactivation (Epstein et al., 1997; Taylor et al., 1997b; Trinh et al., 1999). Chez des embryons de *Xenopus*, l'injection d'une forme mutante de *Xcad2*, où l'homéodomaine fut muté et qui est incapable de lier l'ADN, agit comme un dominant négatif de XCAD, laissant supposer que le N-terminal du mutant séquestre des coactivateurs normalement requis (Epstein et al., 1997). Des activateurs liant la région N-terminale restent toujours à être identifiés mais l'hypothèse de l'interaction des CDX avec des coactivateurs est supportée par une étude rapportant la liaison entre CBP et l'homéodomaine de CDX2 dont l'activation d'un promoteur-cible est potentialisée par cette interaction (Lorentz et al., 1999). De plus nous avons démontré l'efficacité du N-terminal de CDX1 dans la transactivation sur un élément hétérologue en le fusionnant au domaine de liaison à Gal4. De façon surprenante l'homéodomaine de CDX1 semblait bloquer la fonction activatrice du

domaine N-terminal. Il est donc possible que l'homéodomaine doive interagir avec une autre molécule (CBP, LEF1, etc...) afin de libérer la fonction activatrice de sa région N-terminale (M.Béland, non publié).

1.2.4.8. La régulation croisée des *Cdx* entres-eux

Les premiers indices de cette autorégulation furent obtenus à partir de la grenouille, où un dominant négatif XCAD3 diminuait l'expression de *Xcad3* endogène et chez la souris *Cdx2*^{+/-} où des lésions intestinales avaient perdues toute expression de *Cdx2* (Chawengsaksophak et al., 1997; Prinos et al., 2001). Plus tard, un mécanisme d'autorégulation semblable fut découvert chez *Cdx1* en comparant l'expression de *Cdx1* dans les souris de type sauvage, *Cdx1*^{-/-} et *Cdx1*^{+/-}. En effet, la mutation (insertion de la cassette de résistance à la néomycine) qui empêche la traduction de *Cdx1* dans les mutants n'affecte pas la stabilité du messenger, comme en témoigne la comparaison des niveaux d'ARNm de chaque allèle chez des embryons *Cdx1*^{+/-} (Prinos et al., 2001; Subramanian et al., 1995). Malgré la stabilité normale de l'ARNm *Cdx1* mutant, ce messenger devient indétectable chez les homozygotes *Cdx1*^{-/-} à partir du jour E8.5. Ceci laisse croire que la synthèse de la protéine CDX1 est essentielle au maintien de l'expression de *Cdx1* au stade 8.5-9.5. Nos études subséquentes ont également supporté ce point. Quand le niveau de *Cdx1* produit diminue en deçà d'un seuil, situé à moins de 50% des niveaux de bases (d'après les niveaux normaux des hétérozygotes) *Cdx1* ne peut plus s'autoréguler et son expression chute drastiquement. Une forme d'autorégulation fut aussi décrite *in vitro* pour *Cdx2* qui peut lier son promoteur minimal (qui ne possède pas de boîte TATA proprement dite mais plutôt un CDRE) comme mécanisme de rétroaction (Xu et al., 1999). De plus, les lésions présentes dans les souris *Cdx2*^{+/-} n'expriment plus du tout *Cdx2*, ce qui suggère aussi un mécanisme d'autorégulation (Chawengsaksophak et al., 1997). Finalement, si l'on considère que *Xcad3*, l'homologue de *Cdx4* chez la grenouille, lorsque muté en une forme de dominant-négatif, diminue l'expression de *Xcad3*, il est possible que ce mécanisme d'autorégulation s'applique à tous les membres de la famille *Cdx*.

1.2.4.9. La régulation des *Hox* par RA *Wnt* et FGF et *Cdx*

Il y a une cinquantaine d'années, à partir du modèle de grenouille *Xenopus laevis* fut élaborée la théorie de l'activation-transformation afin de rationaliser l'établissement de l'identité du neur ectoderme le long de l'axe AP. Nieuwkoop suggérait qu'un mécanisme en deux étapes prenait place (le modèle d'activation-transformation) où, tout d'abord, le tissu est activé afin de pouvoir former du tissu neural d'identité antérieure (prosencephale) pour ensuite être transformé, par un agent qui « postériorise » le tissu neural d'une façon graduelle. Cette seconde étape est médiée par des signaux qui proviendraient du mésoderme et aussi possiblement de l'épithélium neural (Grapin-Botton et al., 1997; Nieuwkoop, 1999; Stern, 2001).

Cette postériorisation s'accompagne de l'expression de gènes *Hox* de plus en plus 5' du faisceau dans les régions de plus en plus caudales du neuroépithélium. *Wnt*, RA et FGF (Conlon, 1995; Altmann and Brivanlou, 2001; Nieuwkoop, 1999; Sasai and De Robertis, 1997; Stern, 2001) peuvent agir comme agent caudalisant et leur altération modifie le patron d'expression des *Hox* dans le tube neural et peut modifier la morphologie de ce tissu. De façon consistante avec l'origine mésodermale de ces signaux, le mésoderme est aussi sous le contrôle de ces signaux pour l'établissement de son identité AP. Dans une variété de systèmes modèles, ces molécules peuvent abolir l'expression de marqueurs d'identité antérieure de façon concomitante à l'induction de gènes associés à un destin cellulaire plus postérieur.

Parmi les membres de la famille *Wnt*, on note que *Wnt3a* possède un profil d'expression semblable à *Cdx1* dans la portion caudale de l'embryon. La perte de *Wnt3a* entraîne une troncation caudale qui peut s'étendre jusqu'aux membres supérieurs. Un phénotype semblable est observé chez les mutants LEF1/TCF1, les effecteurs nucléaires des *Wnt* (Galceran et al., 1999; Greco et al., 1996; Takada et al., 1994). De façon consistante avec *Wnt3a* jouant un rôle dans la régulation de l'expression de *Cdx1*, des sites consensus pour la liaison des facteurs LEF1/TCF1 sont présents dans le promoteur de *Cdx1* et permettent à

ce dernier de répondre à la signalisation Wnt/LEF dans des cellules F9 ou d'épithélium intestinal (Lickert et al., 2000; Prinos et al., 2001). Des études de transgénèse et de mutations ponctuelles des sites LEF/TCF du promoteur de *Cdx1* *in vivo* ont permis de confirmer le rôle de ces sites dans la régulation normale de ce gène (N. Pilon, non-publié et Lickert and Kemler, 2002).

L'un des rôles de FGF est de spécifier les tissus postérieurs de l'embryon et de permettre le patterning correct de ces tissus chez les vertébrés, incluant la souris (Amaya et al., 1991; Ciruna et al., 1997; Dubrulle et al., 2001; Vasiliasuskas and Stern, 2001; Yamaguchi et al., 1994). Chez la grenouille, on observe que FGF affecte un certain nombre de gènes *Hox* de *Xenopus* (*XHox*) et que cette activité passe possiblement, en partie par *Xcad3*. Ainsi, une surexpression de eFGF ou *Xcad3* résultait en un décalage rostral de l'expression de certains gènes *Hox*, accompagné d'une troncation des régions les plus antérieures. Cependant, ces effets nécessitaient la présence de *Xcad3* car un dominant négatif de *Xcad3* prévenait le décalage d'expression des *Hox* et le phénotype associé à l'excès de eFGF (Cho and De Robertis, 1990; Isaacs et al., 1998; Lamb and Harland, 1995; Pownall et al., 1996).

Chez la souris, la mutation de *Fgfr1* résulte en un patterning anormal du mésoderme de façon associée à des transformations homéotiques vertébrales concomitantes à un décalage dans l'expression de gènes *Hox*. Bien que l'expression des *Cdx* dans ces mutants ne semble pas affectée, les techniques actuelles de détection par hybridation *in situ* ne permettent pas de déceler les diminutions subtiles d'expression. Il est également possible qu'une diminution de *Cdx* soit très transitoire et ait échappé à l'attention. En accord avec une régulation de *Cdx* par FGF, FGF agit possiblement en amont de *Cdx2* dans les cellules trophoblastiques (Chawengsaksophak et al., 1997; Rossant, 2001; Tanaka et al., 1998; Yamaguchi et al., 1994). Chez le poulet, des études récentes ont montré que *Cdx1* médiaient l'induction par FGF2 des gènes *Hox* 5' dans le neurectoderme, alors que RA, plutôt que FGF jouait ce rôle pour les membres des *Hox* plus 3' (Bel-Vialar et al., 2002).

En conclusion, il semble qu'au moins une partie de ces signaux caudalisant (Wnt, RA, FGF) nécessitent la présence des *Cdx* afin d'être perçus correctement. *Cdx1* agit donc comme un intégrateur de plusieurs voies de signalisation impliquées dans le patterning des tissus caudals de l'embryon (Lohnes, 2003).

1.3. Hypothèse et mise en contexte

Au moment d'entreprendre les travaux de recherche qui menèrent au premier article (chapitre 2), peu de choses étaient connues sur la régulation transcriptionnelle de *Cdx1* et sur le rôle qu'il avait sur la transcription des *Hox*. Chez la souris, seul le knockout de *Cdx1* avait été réalisé, démontrant que ce gène était indispensable au patterning vertébral normal de même qu'à l'expression correcte de certains *Hox* dans le mésoderme paraxial. Le rôle d'intégrateur de signaux multiples que semble remplir *Cdx1* n'était pas encore connu, quoique que son importance dans la signalisation de eFGF chez la grenouille ait été rapidement dévoilée.

Notre hypothèse, selon laquelle *Cdx1* pourrait servir d'intermédiaire à la voie des rétinoïdes pour réguler l'expression de certains *Hox* (comme introduit à la fin de la section 1.2.3.4.), était supportée par un certain nombre d'évidences mais un lien direct entre RA et *Cdx1* n'avait jamais été établi.

C'est ainsi que l'article du chapitre 2 résume les expériences qui ont mené à l'identification d'un RARE dans le promoteur de *Cdx1*. Malgré sa séquence atypique, la fonctionnalité de cet élément fut démontré par des essais de transfections et de retards sur gel. De plus, cet article démontre que l'expression normale de *Cdx1* est dépendante de la présence de $RAR\alpha$ 1 et $RAR\gamma$ sans lesquels, son expression est réduite de façon consistante et spécifique au jour E7.5.

Afin de démontrer l'importance de cette séquence RARE dans un contexte entièrement *in vivo*, nous avons réalisé le ciblage et la mutation de cet élément du promoteur de *Cdx1* dans

des cellules souches embryonnaires de souris. C'est le sujet du second article, constituant le chapitre 3 de cette thèse. Cette mutation a un effet marqué et limite l'expression de *Cdx1* entre le jour E7.0 jusqu'au jour E9.5. De plus, ces mutants récapitulaient un sous-ensemble des défauts présents chez les mutants *Cdx1* nuls et révélaient un décalage postérieur dans l'expression de gènes *Hox* impliqués dans le patterning des vertèbres cervicales hautes. Ces études ont aussi permis de dévoiler l'existence d'un second mécanisme permettant à *Cdx1* d'être induit par RA exogène malgré la mutation du RARE mentionné plus haut. Finalement, ces articles démontrent donc qu'en plus d'intégrer les signaux caudalisant Wnt et FGF, comme détaillé dans les dernières sections de l'introduction, *Cdx1* véhiculait aussi le signal de RA, mettant en lumière une nouvelle voie par laquelle RA peut influencer l'expression des *Hox* et conséquemment le patterning vertébral.

Chapitre 2 : Article 1

Cdx1 is a direct RA target gene : a novel pathway for retinoids and vertebral patterning

Martin Houle, Panagiotis Prinos, Angelo Iulianella, Nathalie Bouchard, and David Lohnes

2.1. Avant-propos.

L'article suivant récapitule une série d'expériences réalisées entre septembre 1997 et janvier 2000. Sous la supervision de mon directeur j'ai réalisé la majeure partie des expériences présentées. Je tiens à noter que les figures 1 a, b, e f et g furent entièrement réalisées par Angelo Iulianella, un étudiant au Ph.D, du labo; ces résultats préliminaires ont donné naissance au projet *Cdx1* comme tel. Panagiotis Prinos, stagiaire postdoctoral, fut d'un support important pour certaines hybridations *in situ* sur les mutants $RAR\alpha\gamma$ ainsi que sur les sections d'embryon. J'ajouterais finalement que Nathalie Bouchard, une assistante de recherche fut d'une aide précieuse dans le perfectionnement et l'approfondissement des expériences de retard sur gel. Les souris $RAR\alpha1\gamma$ utilisées furent conçues par croisement de souris $RAR\gamma$ et $RAR\alpha1$ réalisées par mon superviseur et par Thomas Lufkin chez le professeur Pierre Chambon à Strasbourg (France). Ces résultats furent publiés dans la revue *Molecular and Cellular Biology*, septembre 2000, volume 20(17); pages 6579-6586.

2.2. Manuscript

Abstract

Retinoic acid (RA) is required for diverse developmental programs, including vertebral specification. Both RA receptor (RAR) disruption as well excess RA result in homeotic transformations of the axial skeleton. These effects are believed to occur through altered expression of *Hox* genes, several of which have been demonstrated to be direct RA targets. Members of the *cdx* (*caudal*) homeobox gene family are also implicated in regulating *Hox* expression. Disruption of *Cdx1* results in vertebral homeotic transformations and alteration of *Hox* expression boundaries; similar homeosis are also observed in *cdx2* heterozygotes. In *Xenopus*, gain or loss of Cdx function affects vertebral morphogenesis through a mechanism that also correlates with altered *Hox* expression. Taken together with the finding of putative Cdx binding motifs in several *Hox* promoters, these data strongly support a role for Cdx members in direct regulation of expression of at least some *Hox* genes.

Most retinoid-responsive *Hox* genes have not been demonstrated to be direct RA targets, suggesting that intermediaries are involved. Based on the above findings, we hypothesized that one or more *cdx* members may transduce the effects of RA on *Hox* transcription. Consistent with this, we present evidence that *Cdx1* is a direct RA target gene, suggesting an additional pathway for retinoid-dependent vertebral specification.

Introduction

Retinoids, such as RA play key roles in vertebrate development (43). The retinoid signal is transduced by two families of nuclear receptors; the RARs and their isoforms (RAR α 1 and α 2, RAR β 1- β 4, RAR γ 1 and γ 2), and the retinoid x receptors (RXR α , β , γ). These receptors mediate ligand-dependent target gene transcription typically by binding as heterodimers to *cis*-acting response elements (RAREs) (5,14,29,47).

Vertebral specification is believed to be governed by a *Hox* “code”. This model is supported by a multitude of studies which demonstrate that anterior or posterior shifts in *Hox* expression, or ablation of specific *Hox* genes, often leads to alterations in somite identity, inferred by vertebral homeosis (9,13,31). Transplantation experiments suggest that vertebral specification, and hence *Hox* expression boundaries, is established in unsegmented paraxial mesoderm at or shortly following gastrulation (36).

RAR knockout studies and the effects of RA excess demonstrate roles for retinoids in vertebral morphogenesis (9,31). RAR γ null mice display axial malformations, including vertebral homeotic transformations (25). Although disruption of either RAR α or RAR β 2 does not affect skeletal development (27,33), both receptors collaborate with RAR γ in vertebral development, as judged by the marked increase in frequency and severity of axial skeletal defects in the corresponding double null mutants (26). A role for *Hox* genes in this program is suggested by the finding of altered expression of some *Hox* members following RA treatment *in vivo*. Moreover, certain *Hox* mutants phenocopy the axial transformations observed in RAR mutants (25,26). However, despite these correlations, few RA-responsive *Hox* genes have been shown to be direct RAR targets (11,24,35,38,39,45).

Evidence from several lines suggests vertebrate *caudal* homologues are key regulators of *Hox* expression. The murine *caudal* homologues, *Cdx1*, *cdx2* and *cdx4*, are expressed in overlapping domains in the primitive streak region, with expression maintained in the posterior embryo through E12.5 (4,12,34). These expression patterns suggest that a gradient of *cdx* function exists in the posterior embryo, which may reflect a means of regulating expression of different cohorts of *Hox* genes during somite specification (30).

Consistent with this, *Cdx1* null mutants as well as *cdx2* heterozygotes exhibit vertebral homeotic transformations (7,46), which, in the former case, correlate with altered expression of certain *Hox* genes. The finding of consensus Cdx response elements in the promoter regions of several *Hox* loci (4,46) further supports a role for Cdx members in direct regulation of *Hox* expression. Similar observations in *Xenopus* and *C. elegans* suggest that this pathway may be conserved (17,20).

As most RA-responsive *Hox* genes are not known to be direct RAR targets, we hypothesized that a *cdx* member(s) may function as an intermediate. In support of this, we present evidence that *Cdx1* responds to RA and RAR ablation *in vivo* in a manner consistent with it being a direct retinoid target. These results suggest an indirect pathway in which RA regulates *Hox* expression *via* direct control of *Cdx1*.

Materials and Methods

Animals. The RAR γ , RAR α 1 and RAR α 1 γ null mice used in the present study have been described previously (26,27). RAR γ heterozygous and null embryos were generated from RAR $\gamma^{+/-}$ intercrosses whereas RAR α 1 and RAR α 1/ γ null embryos were derived from RAR α 1 $^{-/-}$ / $\gamma^{+/-}$ matings. Wild-type embryos were obtained either from RAR $\gamma^{+/-}$ matings, from intercrosses of wild-type stock from the RAR γ colony (C57BL/6 – 129Sv hybrid), or from CD-1 intercrosses; no overt differences in gene expression or RA-response was noted between any of these backgrounds. Females were dosed by oral gavage with all-*trans* RA dissolved in corn oil to a final delivery of 10 or 100 mg/kg at E7.5, E8.5 or E9.5 (noon of the day of plug was considered E0.5). Animals were sacrificed 1 – 8 hours post-treatment and embryos dissected in phosphate buffered saline (PBS), fixed overnight in 4% paraformaldehyde, dehydrated through a methanol series and stored at -20°C in 100% methanol. Yolk sacs were used to establish genotype by PCR as described previously (19). In some experiments, embryos were treated as described above and the presomitic caudal embryonic region dissected out, snap frozen and stored at -80°C prior to RNA isolation.

***In situ* hybridization analysis and embryo culture.** Embryos were pooled by stage, genotype and RA treatment and rehydrated. Whole mount *in situ* hybridization was performed as described (50) using a riboprobe generated from the *Cdx1* cDNA (34). After hybridization, embryos were cleared and photographed. Some specimens were then post-fixed in 4% paraformaldehyde/0.2% glutaraldehyde at 4°C for 30 minutes, rinsed in several changes of PBS, embedded in Paraplast (Fisher) and sectioned.

Embryo culture was performed essentially as described (15). Embryos were dissected out in PBS containing 10% fetal bovine serum and stored briefly in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) buffered with HEPES. Embryos were cultured in DMEM/rat serum (50:50) pre-equilibrated with 5% O₂/5%CO₂ in N₂ at 37°C. Cultures were maintained for 4

hours in the presence of RA (10^{-9} - 10^{-7} M in DMSO) or vehicle (0.1%) prior to *in situ* hybridization analysis. In some experiments, cycloheximide (30 mg/ml) or vehicle (EtOH; 0.1%) was also included in the culture media for 30 minutes prior to addition of RA or DMSO. To monitor *de novo* protein synthesis in these latter experiments, 100 μ Ci/ml mCi 35 S-methionine was added, and incorporation of label assessed by filter binding as described (10).

Cell Culture and Transfection Analysis. F9 embryocarcinoma cells were maintained in DMEM (Life Technologies) supplemented with glucose (4.5 g/liter), 10% fetal bovine serum and gentamicin (10 μ g/ml). For routine culture, cells were passaged every third day into gelatinized 100 mm tissue culture plates and cultured at 37°C in 5% CO₂. For Northern blot experiments, cells were seeded in 100 mm plates (approximately 10^6 cells/plate) and treated the following day with all-*trans* RA (1 μ M) dissolved in DMSO (final volume 0.1%). Control cultures were treated with DMSO only. For Northern blot analysis, cells were harvested 2-48 hours post-treatment, snap frozen and stored at -80°C prior to RNA extraction.

To assess the requirement for *de novo* protein synthesis, cells were pretreated for thirty minutes with 15 or 30 μ g/ml of cycloheximide, or with vehicle alone, prior to RA treatment. Cells were then harvested, snap frozen and stored as above prior to Northern blot analysis. Parallel cultures were incubated with 40 μ Ci/ml mCi 35 S-methionine, and incorporation of label assessed by filter binding assay as above.

For transfection analysis, cells were passaged into gelatin-treated 6 well faisceau plates (approximately 10^5 cells/well) and transfected 24 hours later using the calcium phosphate method. DNA mixes were comprised of 1.5 μ g of luciferase reporter construct, 0.75 μ g of a *LacZ* expression vector as an internal control and pBKS(+) to a final of 5 μ g DNA per transfection. The following day, media was replenished and cells treated with RA or

DMSO, and culture continued for 24 hrs. Monolayers were then rinsed twice in ice cold PBS, and cells disrupted by addition of 250 μ l lysis buffer (0.1M Tris-Cl pH 8, 1% NP-40, 1 μ M DTT) for 5 minutes at room temperature. Cell lysates were collected and assessed for luciferase and β -galactosidase as described (10), and β -galactosidase activity used to correct for transfection efficiency. Results were corrected for background (empty expression vector) and expressed as the mean of three independent transfections. Unless otherwise stated, each experiment was repeated a minimum of three times.

To assess RA regulation in stable transfectants, 50 μ g of the parental 2 kb *Cdx1* reporter vector was linearized and co-transfected with 5 μ g of a neomycin selection vector. Cells were selected by culture in the presence of 300 μ g/ml G418 (Life Technologies) for two weeks. Clones (approximately 100) were pooled and used to assess RA response by luciferase assay as above.

Northern Blot and Representative cDNA Analysis. Total RNA was extracted from frozen embryos or cell pellets using Trizol (Life Technologies) according to the manufacturers directions. Fifteen μ g of total RNA was resolved by electrophoresis through a formaldehyde gel and subjected to Northern blotting using Hybond N (Amersham) as described by the manufacturer. To quantify differences in embryonic gene expression, caudal tissue (posterior to the closed neural tube) was used for the generation of representative cDNA by PCR as previously described (18) and analyzed by Southern blot. Hybridizations were performed overnight at 42 $^{\circ}$ C in a formamide-based buffer (40% formamide, 0.9M sodium chloride, 50mM sodium phosphate, 2mM EDTA, 4X Denhardts, 0.1% SDS) supplemented with 0.1mg/ml denatured salmon sperm DNA with approximately 10⁶ cpm/ml of denatured probe prepared by random priming. Blots were washed in 2X SSC/0.1% SDS three times at 65 $^{\circ}$ C, followed by three washes in 0.2X SSC/0.1% SDS at the same temperature and signal revealed by autoradiography using X-

Omat film (Kodak). For representative cDNA analysis, following autoradiography, densitometry was performed using Alpha Imager IS-1000 software (Alpha Innotech corporation, San Leandro, CA, USA). Values were normalized with respect to β -actin and expressed as fold change relative to untreated controls.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). The region of the *Cdx1* promoter conveying RA-response, as defined by transfection analysis, was scanned by initially using fragments amplified by PCR. Each fragment was purified, end-labeled with T4 polynucleotide kinase and tested for RAR/RXR binding by EMSA. The putative RARE identified by this approach was evaluated for binding by EMSA using a double-stranded end-labeled oligonucleotide harboring the sequences 5'-AAGGGTCGTGACCCT, or the mutated sequences 5'-AAGGGCAAGTTCCCT (altered nucleotides are underlined). The end-labeled double stranded oligonucleotide 5'-GGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACCTCGCA, harboring a consensus RARE (DR5) was used as a positive control in all binding assays. Nuclear extracts from Cos cells which had either been mock transfected or transfected with expression vectors encoding RAR α and RXR γ were used as a source of protein. Binding reactions, containing approximately 2 ng of probe (50,000 cpm) and 2 μ l of nuclear extract (3 μ g protein) were equilibrated for 30 minutes at room temperature and separated by electrophoresis through a 5% polyacrylamide gel containing 0.25 X TBE. For antibody supershifts, 0.5 μ l of anti-RAR α antibody (Santa Cruz) was added with to protein extracts and equilibrated on ice for 30 minutes prior to addition of probe and further incubation as above. Specificity of binding was assessed by competition with a 100 fold excess of unlabelled RARE nucleotides (sequences noted above) or nucleotides harboring an SP-1 binding motif (5'-TCGATCGGGCGGGGCGA). In other EMSA experiments, electrophoresis was initiated at varying times after probe addition, or using varying amounts of transfected Cos cell extracts.

Isolation of Genomic Sequences and Derivation of Plasmids. Sequences were isolated from a murine phage genomic library. A Bam HI–Not I fragment containing the endogenous transcription initiation site (16) and extending approximately 2 kb 5' was ligated into the promoterless luciferase expression vector pXP2 (37), and subsequent deletion constructs prepared using convenient restriction sites. A reporter bearing the putative *Cdx1* RARE was obtained by ligating either the double stranded oligonucleotide 5'-AAGGGTCGTGACCCCT, harboring the wild-type sequences, or the mutated sequence 5'-AAGGGCAAGTTCCCCT into pTK109 luc. A positive RA-responsive control, RARE-Luc, was derived by ligating the double-stranded oligonucleotide GGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCACTCGCA, bearing the RAR β 2 consensus RARE into pTK109-Luc. Site directed mutagenesis was performed using the Transformer kit (Clontech). All constructs were confirmed by sequencing.

Results

RA induces *Cdx1* *in vivo*. In untreated wild type embryos at E8.5 *Cdx1* transcripts were abundant in the ectoderm and mesoderm in the primitive streak region with weaker expression in caudal neuroepithelium in agreement with previous studies (Fig. 1a; ref. 34). Eight hours following RA gavage (100 mg/kg), expression was markedly increased (Fig. 1b) in all germ layers of the caudal embryo (Fig. 1d, compare to control in 1c), with induction detectable as early as one hour post-treatment (data not shown). Note that in this and other experiments, embryos to be compared were processed in parallel, using the same probe, to control for variables in signal intensity. Note also that experiments were terminated when strong staining was observed in any of the pooled samples. Therefore, untreated embryos are sometimes understained to clearly demonstrate the effect of RA.

In order to calculate induction, semi-quantitative PCR was employed to compare *Cdx1* transcript abundance in control or treated caudal embryo tissue. Treated embryos clearly exhibited a strong induction of message relative to untreated controls (Fig. 1e), whereas *actin* abundance was not affected (Fig. 1f). Densitometric assessment of this regulation revealed a nine fold induction of *Cdx1* signal when normalized for *actin* abundance (Fig. 1g).

Embryo culture was employed to allow administration of known concentrations of RA, and to more precisely regulate the time of exposure. In these experiments, both doses of RA tested (10^{-9} and 10^{-7} M) rapidly induced *Cdx1* expression (Fig. 1i and j, compare to control in 1h). Notably, the lower concentration is in close agreement with the K_d of the RARs for RA (2), further supporting a physiological role for retinoids in regulating *Cdx1* expression. Similar results were obtained using a low dose of RA (10 mg/kg) *in vivo* at E8.5 (data not shown), and in tissue culture models (see below).

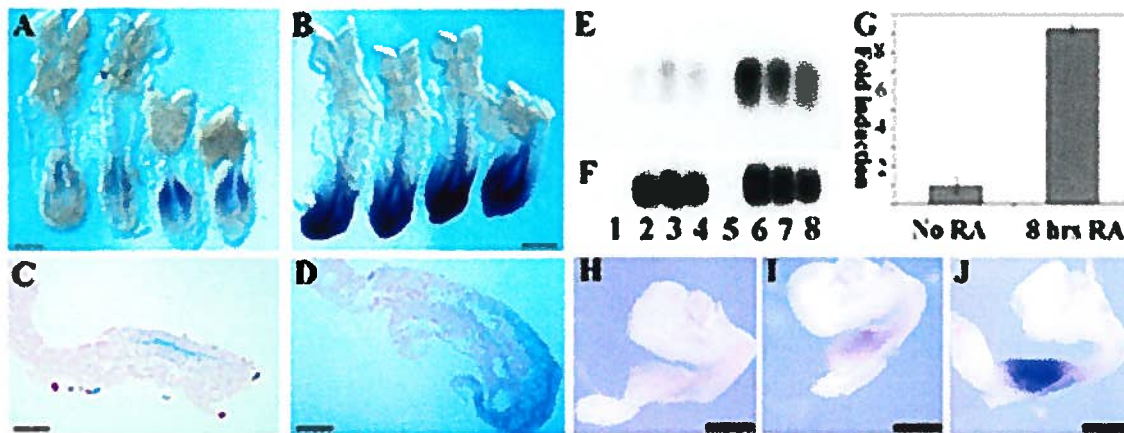


Figure 1. Induction of *cdx1* by RA in vivo. *Cdx1* expression in E8.5 embryos treated with vehicle (A) or 8 hours following gavage with 100 mg/kg RA (B). (C,D) Sagittal sections of representative embryos shown in A and B, respectively. Note the marked induction in signal throughout the caudal embryo. (E-G) Semi-quantitative analysis of *Cdx1* expression. Representative cDNA Southern blots were generated from E8.5 caudal tissue as described in materials and methods and hybridized to either *Cdx1* (E) or β -actin (F) probes. Compare basal expression (panel E, lanes 2-4) to expression following 4 hours RA treatment (lanes 6-8). β -actin expression from the same material (F) was not affected. Densitometry from the blots shown in panel E and F was performed and *Cdx1* expression levels normalized to β -actin. Results (G) are expressed relative to untreated controls, and indicate a nine fold induction. Due to saturation of the x-ray film in the lanes from the treated samples, this is likely an under-representation of regulation. (H-J) *Ex vivo* response of *Cdx1* to RA. E8.5 Embryos were excised and cultured for four hours in the presence of vehicle (H), 10^{-9} M RA (I) or 10^{-7} M RA (J) following which *Cdx1* expression was assessed by whole mount *in situ* hybridization. Scale bars (A,B, H-J) 500 μ m; (C,D) 250 μ m.

RA induces *Cdx1* expression at several developmental stages. In the mouse, exogenous RA can evoke vertebral homeosis from E7.5–9.5 in a manner that is coincident with altered *Hox* expression (22). We therefore determined if *Cdx1* responded to RA throughout this window. In untreated embryos at E7.5, *Cdx1* expression was observed in the ectoderm and mesoderm of the primitive streak region as described previously (Fig. 2a; ref. 34), whereas RA evoked a strong induction of expression in the entire streak region at this stage (Fig. 2b). Interestingly, treatment appeared to induce *Cdx1* precociously in embryos where expression either had not yet commenced or was only weakly detected (e.g. Fig. 2e versus 2f). At E9.5, *Cdx1* transcripts in the caudal embryo were present at low levels (Fig. 2i). At this stage, hybridization was observed in the forelimb bud mesenchyme (asterisk, Fig. 2i), with weaker expression sometimes observed in presumptive dermamyotome (arrowhead, Fig. 2i, and ref. 34). Four hours following treatment at E9.5, message was markedly induced in all of these domains, with a stronger signal consistently observed in dermamyotome (Fig. 2j).

Cdx1 expression is altered in RAR null mutants. Compared to wild-type controls, *Cdx1* expression was not overtly different in RAR α 1 or RAR γ single mutants at E7.5–9.5 (data not shown). In contrast, E7.5 RAR α 1/ γ double mutants always exhibited reduced *Cdx1* expression in the primitive streak region (compare Fig. 2c and 2a). In marked contrast, transcript levels in the primitive streak region of these mutants at E8.5 was often comparable to wild-type embryos (e.g. Fig. 2g versus 1a and data not shown). At E9.5, expression in the tail bud was either comparable or too weak to compare between RAR α 1/ γ mutants and controls. Similar variability was also seen as regards expression in the limb buds and dermamyotome of these mutants, with expression sometimes weaker than stage-matched wild type controls (e.g. Fig. 2k versus 2l). However, differences in expression were not consistently observed between RAR α 1/ γ and controls at E9.5. Similar variability in signal intensity was often seen in control E9.5 samples, suggesting highly variable and

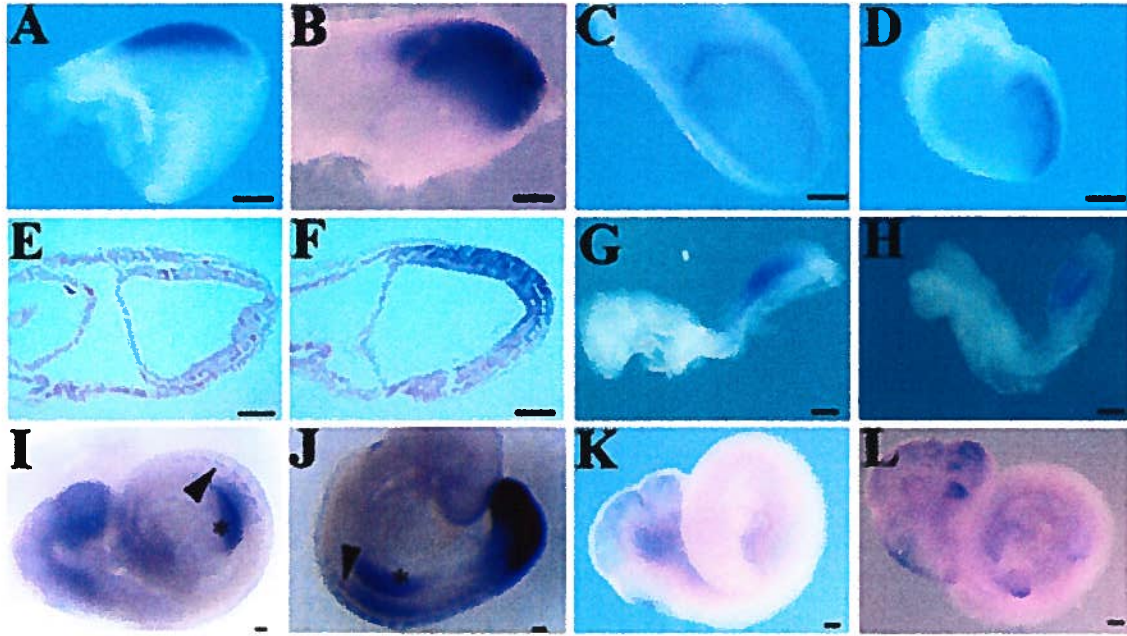


Figure 2. *Cdx1* expression in wild type and $RAR\alpha_1\gamma$ mutant embryos. Whole mount analysis of *Cdx1* expression in E7.5 wild-type without (A,E) or 4 hours following (B,F) RA treatment. Note induction throughout the primitive streak region in the treated samples. (C,D) Expression in untreated (C) and RA treated (D) E7.5 $RAR\alpha_1\gamma$ mutant embryos. Note the reduced expression in the untreated mutant relative to wild type (C versus A) and the decreased effects of RA on expression in the mutant background relative to controls (compare mutants in C and D relative to wild types in A and B). (I,J) *Cdx1* expression in wild type embryos at E9.5 without (I) and following (J) RA treatment. In untreated embryos, weak expression of *Cdx1* was observed in the tail bud, with transcripts also evident in the forelimb bud and dermamyotome (asterisk and arrowhead, respectively, in I); RA strongly induced expression in all of these domains (J, compare to I). In $RAR\alpha_1\gamma$ null embryos at E8.5 (G,H) and E9.5 (K,L), RA-induction was reduced relative to that seen in wild type samples (compare effects of treatment in mutants in G and H, K and L to the effect on wild type controls in Fig. 1A and B, and Fig. 2I and J). Scale bars; A-F, 50 μm ; G,H, 100 μm ; I-L, 75 μm .

dynamic expression of *Cdx1* at this stage. Such variance precluded accurate determination of the effects of RAR loss on *Cdx1* levels at this stage.

We also determined whether RAR α 1 and/or RAR γ were required for induction of *Cdx1* by exogenous RA. Following treatment at E8.5, caudal *Cdx1* expression in RAR α 1 null embryos was comparable to wild-types, whereas induction in RAR γ mutants was only modestly reduced relative to wild-type controls (data not shown). In contrast, induction in RAR α 1/ γ mutants was markedly compromised in all normally responsive domains (primitive streak, dermamyotome and forelimb bud) at all stages examined (compare untreated mutants in Figs. 2c,g and k with treated stage-matched samples in Figs. 2d,h and l. Compare the relative induction in these double mutants to that seen in wild type specimens at comparable stages (see Fig. 1a and b for E8.5 wild type embryos).

***Cdx1* is a direct RA target.** To further investigate the effects of RA on *Cdx1* expression, we employed F9 embryocarcinoma cells. In these cultures, RA up-regulated *Cdx1* transcript levels as early as two hours after treatment, with a maximum level attained after 24-48 hours (Fig. 3a). In both F9 cells (Fig.3b) and in embryo culture (Fig.3c-f), this response was independent of *de novo* protein synthesis, as induction was evident in the absence or presence of cycloheximide (cycloheximide treatment resulted in a 95% or greater inhibition of *de novo* protein synthesis in either system). Notably, in embryo culture, *Cdx1* message was increased by cycloheximide treatment alone (Fig. 3e compare to 3c), whereas a further increase in message abundance was seen upon subsequent treatment with RA (Fig. 3f). This “superinduction” effect suggests both an increase in transcription as well as stabilization of message, a common phenomenon for immediate-early target genes.

Figure 3. *Cdx1* induction is independent of *de novo* protein synthesis. (A) *Cdx1* expression in F9 cells treated with RA (lanes 2,4,6,8,10) or DMSO (lanes 3,5,7,9,11) for the indicated times. (B) Northern blot of RNA from F9 cells treated for 4 hours with RA (lanes 2,4,6) or DMSO (lanes 1,3,5) with the indicated amounts of cycloheximide. Both blots were reprobed for β -actin as a loading control. (C-D) *Cdx1* expression in cultured embryos. Embryos were cultured for four hours in the presence of vehicle (C), 20 μ g/ml cycloheximide (E), 10^{-6} M RA (D) or RA plus cycloheximide (F) prior to *in situ* hybridization. Results shown are typical of several experiments. Scale bar C-F, 400 μ m.

We further investigated the mechanism of transcriptional regulation by transfection approaches. The genomic region of *Cdx1* comprising approximately 2 kb of 5' sequences, including the endogenous transcriptional start site and a portion of the 5' untranslated region (5'-UTR) (16), were as potent as a synthetic RARE at eliciting an RA response in transient transfection assays in F9 cells (Fig. 4a). Removal of sequences comprising the endogenous transcriptional start site and 5'-UTR revealed that the remaining, non-transcribed, sequences evoked an induction in transfection assays when coupled to a heterologous promoter (data not shown; see also below), suggesting that RA response was not mediated through post-transcriptional mechanisms operating via the 5' UTR. Finally, the 2 kb reporter was used to establish stable-integrated reporter cell lines. These lines responded to low (10^{-9} M) levels of RA in dose-response experiments (data not shown) indicating that, as for the situation *in vivo*, this region conveyed a response to physiological levels of RA.

Deletion analysis and transfection assays mapped the RA response region between -694 and -185 relative to the transcription start site (Fig. 4a). As a typical RARE (DR5) was not observed in these sequences, EMSAs were employed to identify the element. These experiments identified the motif AAGGGTCGTGACCCT as a target for RAR/RXR binding, and demonstrated that all parameters of the *Cdx1* RARE investigated by EMSA were identical to those exhibited by the control DR5 element (left and right sides of Fig 4b, respectively). In particular, receptor binding to *Cdx1* sequences was efficiently competed with excess unlabeled self or consensus DR-5 RARE sequences, but not by an SP-1 binding motif or mutated *cdx-1* RARE. Conversely, the putative *Cdx1* RARE, but not the mutated element, competed efficiently for binding to the DR5 RARE. Specificity was further confirmed by supershift assays, which demonstrated the presence of RAR α in the complex. Although this supershift was not quantitative (for unknown reasons), both the *Cdx1* and DR5 elements exhibited identical degrees of antibody retention (compare Super Shift binding between lanes 4 and 11, Fig. 4b).

The relative affinity between the *Cdx1* and DR5 motifs was also assessed by varying either RAR/RXR concentration or comparing the relative binding as a function of reaction time. These data suggest that the *Cdx1* motif is tightly associated with receptor complexes relative to the DR5 control element, differing by approximately 2 fold (Fig. 4D and data not shown). Moreover, the *Cdx1* sequences exhibited only modestly slower kinetics of association relative to the DR5 element (Fig. 4E). This is consistent with the finding that the *Cdx1* RARE was absolutely essential for retinoid response in the context of the 2 kb promoter, as mutation of this motif completely abolished response in F9 cells in the context of the native sequences (Fig. 4c). Moreover, a single copy of this element was also sufficient to confer RA-response to a heterologous basal promoter (Fig. 4c). This latter observation is consistent with the fact that these *Cdx1* sequences bear remarkable similarity to the rat growth hormone promoter TRE which has previously been shown to confer RA response in transfection assays (49). The finding that these

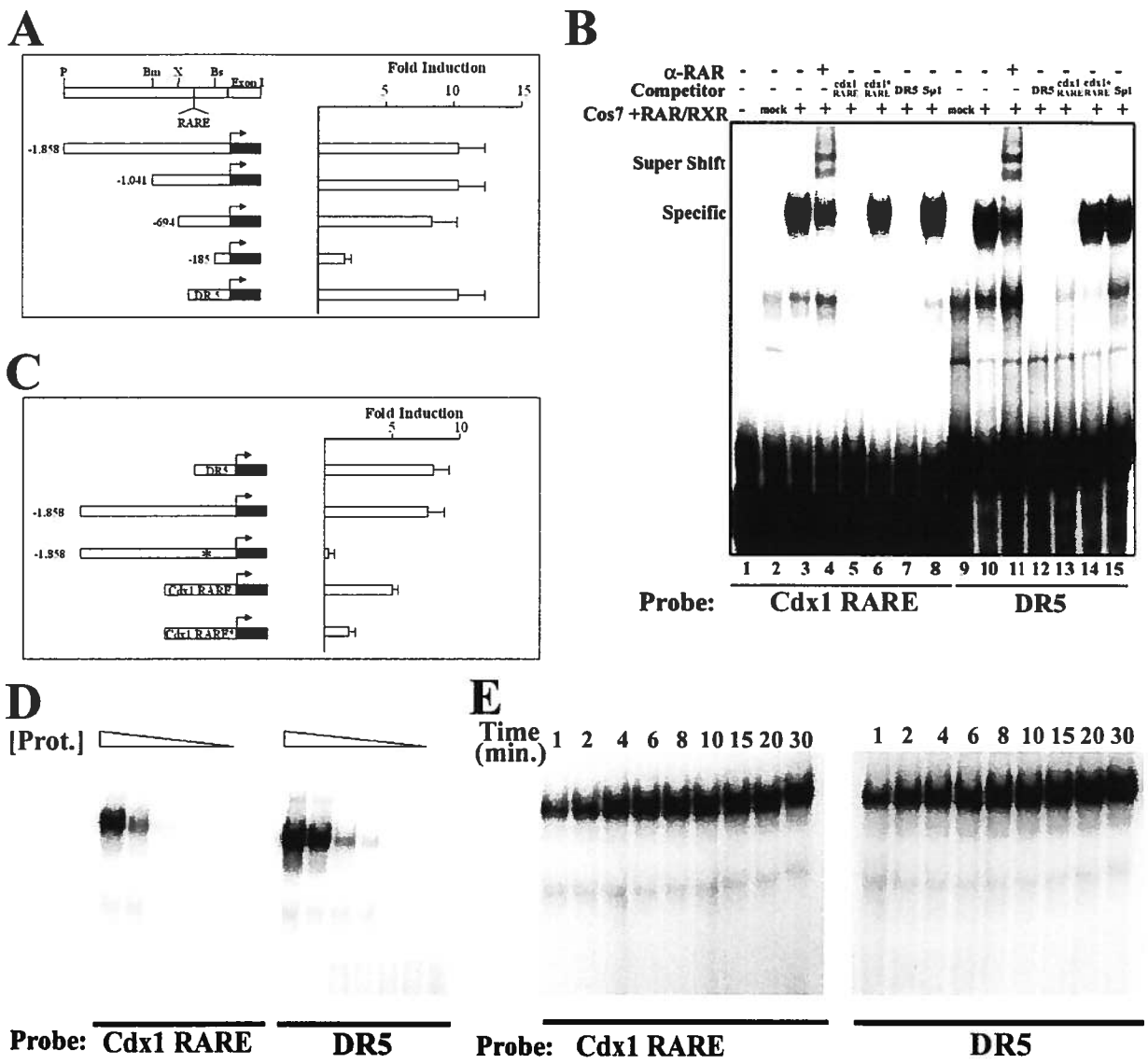


Figure 4

Figure 4. Identification of an RARE in the *Cdx1* promoter. (A) F9 cells were transfected with the indicated reporter constructs and luciferase activity determined 24 hours following treatment with 10^{-6} M RA. Results are expressed as fold induction by RA relative to untreated cultures. Bm, BamH I; Bs, BstX I; P, Pst I; X, Xmn I. Numbering to the left indicates the 5'-most position relative to the transcriptional start site. DR5 is the positive control reporter construct. (B) *Cdx1* RARE motif was tested for receptor binding by EMSA using radiolabeled oligonucleotides indicated at the bottom of the panel. Lane 1; no extract. Lane 2 and 9 mock transfected cells. Lanes 3-8 and 10-15; *Cdx1* RARE and DR5, respectively, incubated with extracts from cells transfected with RAR α plus RXR γ . Specific binding complexes ("Specific") were not affected by non-specific competitor (lanes 8 or 14) or mutated *Cdx1* RARE (lanes 6 or 14) but were competed by excess DR5 (lanes 7 or 12) or *Cdx1* RARE (lanes 5 or 13). Super shift indicates complexes formed by incubation with anti-RAR α (lanes 4 and 11). (C). Transfection analysis as in (A) indicates that point mutation of the RARE sequences ("*") in the context of the 2kb parental *Cdx1* promoter results in complete loss of RA-induction in F9 cells. A single copy of the *Cdx1* RARE motif confers RA response with a heterologous promoter, and this effect is lost upon mutation of these sequences (*Cdx1* RARE*). (D,E) Stability of the receptor association with the *Cdx1* RARE compared to the canonical DR5 RARE. (D) Comparable amounts of both probes were incubated with different amount of extracts from receptor-transfected Cos cells for 30 minutes before electrophoresis. Protein used was 3.00, 1.00, 0.30, 0.10, 0.030, 0.01, 0.00 μ g/incubate. (E) *Cdx1* RARE and DR5 probes were incubated with 3 μ g of Cos extracts for the indicated amount of time and binding complexes resolved by electrophoresis.

sequences are perfectly conserved in the human *Cdx1* promoter (data not shown) further suggests a conserved, and important, role for this element in directing expression.

Discussion.

Many *Hox* genes respond to RA both in tissue culture and *in vivo* and this relationship is believed to be a principle means by which retinoids act in vertebral specification (Maldonado et al., 1999c). Although a number of *Hox* genes have been shown to be direct RA-targets, the mechanism(s) by which RA affects expression of most responsive *Hox* genes is largely unknown. Our present findings demonstrate that *Cdx1* is a direct RA target, which, together with the established relationship between Cdx and *Hox* gene expression, strongly suggests a novel pathway for retinoids in axial specification.

Contribution of RA to *Cdx1* expression. Findings from several models illustrate a role for *caudal* family members in A-P patterning. *Cdx1* null mutants exhibit anterior vertebral homeosis which are coincident with posterior shifts in the expression boundaries of certain *Hox* genes; similar vertebral defects are also observed in *cdx2* heterozygotes (7,46). In *Xenopus*, gain or loss of *Xcad* function (the frog homologue of *cdx4*) results in patterning defects which correlate with altered *Hox* gene expression along the A-P axis (18). Taken together with the presence of potential Cdx response elements in a number of *Hox* promoters (6,46), these data support a role for Cdx members in direct control of *Hox* expression.

Our finding that *Cdx1* is a direct RA target is in agreement with a number of observations. The homeotic transformations and rib fusions observed in *Cdx1* null offspring (46) are reminiscent of the axial skeletal malformations exhibited by certain RAR null offspring (26). This similarity occurs both with respect to the nature of the defects as well as their location along the vertebral column, being largely restricted to the cervical region in both

classes of mutants. Consistent with this, a reduction of *Cdx1* message was also apparent in RAR α 1/ γ mutants at E7.5. This is in agreement both with the window during which the cervical vertebrae are presumed to be specified and with the high frequency of vertebral defects observed in RAR α 1/ γ mutants relative to RAR α 1 null offspring (which appear normal). However, reduction of *Cdx1* expression was not observed in RAR γ null embryos. This may relate to the low incidence of homeosis seen in these mutants (25) suggesting that effects on *Cdx1* levels may be observed only at a correspondingly low frequency and/or may be too subtle to readily detect by *in situ* hybridization techniques.

Our present data are also entirely consistent with retinoid distribution studies. In the mouse, biologically active retinoids are first detected in the primitive streak at E7.5 (3,41). This correlates closely with the time of appearance of *Cdx1* transcripts (34), and the ability of exogenous RA to precociously induce *Cdx1* at this time. Moreover, *Cdx1* expression was strongly reduced in RAR α 1/ γ null embryos at E7.5. The finding that expression at E8.5 was not reproducibly altered in the double mutant background is likely related to the fact that retinoid activity is greatly reduced or absent in the primitive streak region commencing at the time(41).

The preceding observations suggest that RA plays a role in the initial period of *Cdx1* expression (perhaps to initiate expression), but that an additional factor(s) is involved in maintaining later phases of transcription. In this regard, in *Xenopus* FGF regulates *Hox* expression *via* control of *Xcad* (17,40). Taken together with our present findings, this suggests that both retinoid and FGF signaling converge on a common target gene. Indeed, FGF and RA synergize in inducing posterior *Hox* genes in *Xenopus* (8). However, whether this mechanism can be extrapolated to other vertebrates is unclear, as a relationship between FGF and *cdx* expression has not been described in the mouse.

RAR-specific regulation of *cdx-1*. Studies in F9 cells suggest a key role for RAR γ in induction of *Cdx1* (48), an observation that contrasts with our findings *in vivo*. However,

cdx1 induction in F9 cells is only maximal after 24-48 hours of treatment, which is in marked disparity to induction in vivo which is evident 1 hour post-treatment. This difference may be due, in part, to the fact that RAR γ null F9 cells are refractory to RA-induced differentiation, suggesting that additional RAR γ -dependent events impact on *cdx1* transcription. Interestingly, another RA target gene, CYP26, exhibits similar differences between regulation in vivo and in F9 cells (1,18). Although the basis for these discrepancies are speculative, these findings may be indicative of common cell-type specific regulatory mechanisms which govern control of expression of these, and perhaps additional, RA-target genes.

RA, Hox expression and somite specification. RA has been suggested to be a “posteriorizer” in the activation-transformation model of neurulation (reviewed in (42)). RA can impart more posterior molecular characteristics on anterior neuroepithelium, and interference with RAR signaling in *Xenopus* or vitamin A deficiency in quail results in hindbrain patterning defects, presumably due to effects on target genes such as *Hoxa1* and *Hoxb1* (11,23,28,32,44,45). However, to date, a somite-specific RARE essential for expression of a *Hox* member which has definitive function in paraxial mesoderm has not been described. As defects in *cdx1* null mice appear related only to somitic *Hox* mis-expression, it is tempting to speculate that RA-dependent vertebral specification may manifest largely through *cdx1*. In contrast, the non-homeotic axial patterning defects observed in RAR α/γ double mutant offspring which are not exhibited by *Cdx1* mutants clearly underscores the existence of other retinoid target genes involved in vertebral morphogenesis, the nature of which are unknown.

***Cdx1* and retinoid-induced teratogenesis.** Excess RA has profound effects on vertebrate development, and is capable of eliciting, among other malformations, neural tube and limb defects, axial truncation and homeotic transformation depending on both dose and the

embryonic stage upon exposure. As overexpression of *cdx* members can lead to neural tube defects in mouse embryos as well as caudal malformations of *Xenopus* tadpoles (6,18), RA excess could conceivably exert some of its teratogenic effects through misexpression of *Cdx1*. In this regard, RAR γ is essential for retinoid-induced axial truncation (25). The finding that *Cdx1* induction in RAR γ mutants was only modestly compromised suggests that it is not involved in eliciting this malformation. However, in *Xenopus*, relatively small changes in *XCad3* gene dosage result in dramatic differences in phenotypic outcome (18). Thus, we cannot exclude that the relatively small difference in *Cdx1* induction in RAR γ mutants is significant.

Current models suggest that upregulation of *cdx* should lead to posterior transformation concomitant with anteriorization of *Hox* expression domains, whereas loss of Cdx function should lead to the converse situation. RA exposure at E7.5-9.5 induces *Cdx1*, yet posteriorization events are only seen following treatment at E7.5. Exposure at later stages results in predominantly anterior transformation with loss of *Hox* expression (21,22). At least two possibilities may explain these observations. First, as previously discussed (17), the overall level of Cdx proteins may be of importance, and induction of *Cdx1* may be offset by reduction of *cdx2* (our preliminary observation) and *cdx4* (18), thus resulting in a loss of function situation at E8.5 and E9.5. Alternatively, Cdx members may differentially regulate target genes, as previously suggested (6). Additional studies are needed to address this as well as to further investigate the relationship between RA, *cdx* and *Hox* expression.

Reference List

1. **Abu-Abed, S. S., B. R. Beckett, H. Chiba, J. V. Chithalen, G. Jones, D. Metzger, P. Chambon, and M. Petkovich.** 1998. Mouse p450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid x receptor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**:2409-2415.
2. **Allenby, G., M. T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J. F. Grippo, P. Chambon.** 1993. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**:30-34.
3. **Balkan, W., M. Colbert, C. Bock, and E. Linney.** 1992. Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**:3347-3351.
4. **Beck, F., T. Erler, A. Russell, and R. James.** 1995. Expression of *cdx-2* in the mouse embryo and placenta possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* **204**:219-227.
5. **Chambon, P.** 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**:940-954.
6. **Charité, J., W. de Graaff, D. Consten, M. J. Reijnen, J. Korving and J. Deschamps.** 1998. Transducing positional information to the *Hox* genes: critical interaction of *cdx* gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* **125**:4349-4358.
7. **Chawengsaksophak, K., R. James, V. E. Hammond, F. Kontgen, and F. Beck.** 1997. Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* **386**:84-87.

8. **Cho, K. W. and E. M. De Robertis.** 1990. Differential activation of *Xenopus* homeobox genes by mesoderm- inducing growth factors and retinoic acid. *Genes Dev.* **4**:1910-1916.
9. **Conlon, R. A.** 1995. Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends in Genetics* **11**:314-319.
10. *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
11. **Dupe, V., M. Davenne, J. Brocard, P. Dolle, M. Mark, A. Dierich, P. Chambon, and F. M. Rijli.** 1997. In vivo functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**:399-410.
12. **Gamer, L. W. and C. V. Wright.** 1993. Murine *cdx-4* bears striking similarities to the drosophila *caudal* gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* **43**:71-81.
13. **Gellon, G. and W. McGinnis.** 1998. Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of hox expression patterns. *Bioessays* **20**:116-125.
14. **Heyman, R. A., D.J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, R. B. Stein, G. Eichele, R. M. Evans, and C. Thaller.** 1992. *9-cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid x receptor. *Cell* **68**:397-406.
15. **Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, and E. Lacy.** 1994. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
16. **Hu, Y., J. Kazenwadel, and R. James.** 1993. Isolation and characterization of the murine homeobox gene *Cdx-1*. Regulation of expression in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **268**:27214-27225.

17. **Isaacs, H. V., M. E. Pownall, and J. M. Slack.** 1998. Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO J.* **17**:3413-3427.
18. **Iulianella, A., B. Beckett, M. Petkovich, and D. Lohnes.** 1999. A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev. Biol.* **205**:33-48.
19. **Iulianella, A. and D. Lohnes.** 1997. Contribution of retinoic acid receptor gamma to retinoid-induced craniofacial and axial defects. *Dev. Dyn.* **209**:92-104.
20. **Kenyon, C. J., J. Austin, M. Costa, D. W. Cowing, J. M. Harris, L. Honigberg, C. P. Hunter, J. N. Maloof, M. M. Mullerimmergluck, S. J. Salser, D. A. Waring, B. B. Wang, and L. A. Wrischnik.** 1997. The dance of the hox genes patterning the anteroposterior body axis of *caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **62**:293-305.
21. **Kessel, M.** 1992. Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* **115**:487-501.
22. **Kessel, M. and P. Gruss.** 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**:89-104.
23. **Kolm, P. J., V. Apekin, and H. Sive.** 1997. *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev. Biol.* **192**:1-16.
24. **Langston, A. W., J. R. Thompson, and L. J. Gudas.** 1997. Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the *Hox a* and *Hox b* homeobox gene faisceaux. Functional analysis. *J. Biol. Chem.* **272**:2167-2175.
25. **Lohnes, D., P. Kastner, A. Dierich, M. Mark, M. LeMeur, and P. Chambon.** 1993. Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**:643-658.

26. **Lohnes, D., M. Mark, C. Mendelsohn, P. Dolle, A. Dierich, P. Gorry, A. Gansmuller, and P. Chambon.** 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (i). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**:2723-2748.
27. **Lufkin, T., D. Lohnes, M. Mark, A. Dierich, P. Gorry, M. P. Gaub, M. LeMeur, and P. Chambon.** 1993. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**:7225-7229.
28. **Maden, M., E. Gale, I. Kostetskii, and M. Zile.** 1996. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Current Biology* **6**:417-426.
29. **Mangelsdorf, D. J., U. Borgmeyer, R. A. Heyman, J. Y. Zhou, E. S. Ong, A. E. Oro, A. Kakizuka, and R. M. Evans.** 1992. Characterization of three RXR genes that mediate the action of *9-cis* retinoic acid. *Genes Dev.* **6**:329-344.
30. **Marom, K., E. Shapira, and A. Fainsod.** 1997. The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech. Dev.* **64**:41-52.
31. **Marshall, H., A. Morrison, M. Studer, H. Popperl, and R. Krumlauf.** 1996. Retinoids and *Hox* genes. *FASEB J.* **10**:969-978.
32. **Marshall, H., M. Studer, H. Popperl, S. Aparicio, A. Kuroiwa, S. Brenner, and R. Krumlauf.** 1994. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*. *Nature* **370**:567-571.
33. **Mendelsohn, C., M. Mark, P. Dolle, A. Dierich, M. P. Gaub, A. Krust, C. Lampron, and P. Chambon.** 1994. Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev. Biol.* **166**:246-258.

34. **Meyer, B. I. and P. Gruss.** 1993. Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* **117**:191-203.
35. **Morrison, A., M. C. Moroni, L. Ariza-McNaughton, R. Krumlauf, and F. Mavilio.** 1996. *In vitro* and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid- responsive enhancer. *Development* **122**:1895-1907.
36. **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.
37. **Nordeen, S. K.** 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* **6**:454-458.
38. **Packer, A. I., D. A. Crotty, V. A. Elwell, and D. J. Wolgemuth.** 1998. Expression of the murine *Hoxa-4* gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* **125**:1991-1998.
39. **Popperl, H. and M. S. Featherstone.** 1993. Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine *hox-4.2* gene. *Mol. Cell. Biol.* **13**:257-265.
40. **Pownall, M. E., A. S. Tucker, J. M. Slack, and H. V. Isaacs.** 1996. eFGF, *Xcad3* and *Hox* genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* **122**:3881-3892.
41. **Rossant, J., R. Zirngibl, D. Cado, M. Shago, and V. Giguere.** 1991. Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* **5**:1333-1344.
42. **Sasai, Y. and E. M. De Robertis.** 1997. Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev. Biol.* **182**:5-20.

43. **Sporn, M. B., A. B. Roberts, and D. S. Goodman.** 1994. M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman (ed.), *The Retinoids*. Raven Press, New York.
44. **Studer, M., A. Gavalas, H. Marshall, L. Ariza-McNaughton, F. M. Rijli, P. Chambon, and R. Krumlauf.** 1998. Genetic interactions between *hoxa1* and *hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* **125**:1025-1036.
45. **Studer, M., H. Popperl, H. Marshall, A. Kuroiwa, and R. Krumlauf.** 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of *hoxb-1*. *Science* **265**:1728-1732.
46. **Subramanian, V., B. I. Meyer, and P. Gruss.** 1995. Disruption of the murine homeobox gene *cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of *hox* genes. *Cell* **83**:641-653.
47. **Sucov, H. M. and R. M. Evans.** 1995. Retinoic acid and retinoic acid receptors in development. *Mol. Neurobio.* **10**:169-184.
48. **Taneja, R., P. Bouillet, J.F. Boylan, M.P. Gaub, B. Roy, L.J. Gudas, and P. Chambon.** 1995. Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**:7854-7858.
49. **Umesono, K., V. Giguere, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, and R. M. Evans.** 1988. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* **336**:262-265.
50. **Wilkinson, D. G.** 1992. D.G. Wilkinson (ed.), *In Situ Hybridization. A Practical Approach*. IRL Press, New York.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Peter Gruss for Cdx-1 cDNA, Prof. P. Chambon for the RAR null lines, Dr. Mark Featherstone, Deborah Allan and other members of the group for their thoughtful suggestions. This work was supported by the March of Dimes Birth Defects Foundation (FY98-0562) and the MRC of Canada. M.H. and A.I are supported by studentships from the MRC of Canada, P.P. by a fellowship from the Spina Bifida and Hydrocephalus association of Ontario/MRC, and D.L. by the FRSQ (Junior 2).

Chapitre 3 : Article 2

Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function *in vivo*

Martin Houle, Jean-René Sylvestre et David Lohnes

3.1. Avant propos

Cet article résume une série d'expériences réalisée entre septembre 2000 et septembre 2003 où sont rapportés les résultats de la mutation ponctuelle du RARE de *Cdx1* endogène chez la souris. Bien que toutes les expériences soient mon œuvre, je tiens à souligner les nombreuses suggestions de mon superviseur le Dr David Lohnes, ainsi que le soutien technique de Jean-René Sylvestre, technicien animalier responsable des croisements et génotypages des différentes lignées utilisées. La lignée de souris RAR γ utilisée fut établie par mon superviseur chez le professeur Chambon, alors que la lignée mutante *Cdx1* fut réalisée par Barbara Meyer chez le Dr Peter Gruss et est un gracieux don de ces derniers. Cet article sera publié dans la revue *Development* en décembre 2003, 130 (26) :6555-6567.

3.2. Manuscript

3.3. Summary

Hox gene products are key players in establishing positional identity along the anteroposterior (A-P) axis. In vertebrates, gain or loss of *Hox* expression along the A-P axis often leads to inappropriate morphogenesis, typically manifesting as homeotic transformations affecting the vertebrae and/or hindbrain. Various signalling pathways are known to impact on *Hox* expression, including the retinoid signalling pathway. Exogenous retinoic acid (RA), disruption of enzymes involved in maintaining normal embryonic RA distribution, or mutation of the retinoid receptors (RARs and RXRs) can all impact on *Hox* expression with concomitant effects on A-P patterning.

A number of *Hox* loci have well characterized RA response elements (RAREs), which have been shown to regulate functionally-relevant *Hox* expression in the neurectoderm. A similar critical function for any RARE in mesodermal *Hox* expression has, however, not been documented. The means by which RA regulates mesodermal *Hox* expression could therefore be either through an undocumented direct mechanism or through an intermediary; these mechanisms are not necessarily exclusive. In this regard, we have found that *Cdx1* may serve as such an intermediary (Houle et al. Mol. Cell. Biol. 20, 6579-6586, 2000). *Cdx1* encodes a homeobox transcription factor which is critical for normal somitic expression of several *Hox* genes, and is regulated by retinoid signalling in vivo and in vitro likely through an atypical RARE in the proximal promoter. In order to more fully understand the relationship between retinoid signalling, *Cdx1* expression and A-P patterning, we have derived mice in which the RARE has been functionally inactivated. These RARE null mutants exhibit reduced expression of *Cdx1* at all stages examined, vertebral homeotic transformations and altered *Hox* gene expression which correlates with certain of the defects seen in *Cdx1* null offspring. These findings are consistent with a

pivotal role for retinoid signalling in governing a subset of expression of *Cdx1* critical for normal vertebral patterning.

Introduction

The *Hox* gene products are key players in anteroposterior (A-P) patterning of the vertebrate axis (reviewed in (Krumlauf, 1994; Gellon and McGinnis, 1998; Kessel and Gruss, 1991; Burke et al., 1995). The 39 murine *Hox* genes encode transcription factors possessing a conserved sixty amino acid DNA binding motif, the homeodomain (Gehring, 1993; Phelan et al., 1995). Mammalian *Hox* genes are distributed in four faisceaux, *Hoxa* - *Hoxd*, on separate chromosomes and which have been proposed to have evolved by duplication of an ancestral complex related to the *HOM-C* genes of drosophila (Duboule and Dolle, 1989; Duboule, 1998; Ferrier and Holland, 2001). In the mouse, *Hox* gene expression is initiated at embryonic day (E)7.5 in the primitive streak, with expression subsequently expanding anteriorly in the neural tube and mesoderm until a predetermined rostral limit is reached (Deschamps and Wijgerde, 1993; Oosterveen et al., 2003; Roelen et al., 2002). Both the onset and the rostral limit of expression is generally related to the physical location of a given *Hox* gene within its complex; more 3' *Hox* members are expressed earlier and reach a more rostral limit of expression relative to more 5' paralogs. This pattern of expression, referred to as colinearity, results in nested domains of *Hox* gene expression along the A-P axis which is believed to comprise a "*Hox* code" (Kessel and Gruss, 1991; Burke et al., 1995; Gaunt, 1994).

A wealth of information underscores critical roles for *Hox* proteins in A-P patterning of derivatives of all germ layers, including the vertebrae. Somites, which arise from segmentation of paraxial mesoderm, differentiate into dermamyotome and sclerotome, the latter of which is the anlage of the vertebrae. Altered *Hox* expression has well-documented effects on vertebral patterning, typically manifesting as homeotic transformations along the A-P axis (Christ and Ordahl, 1995; Chen et al., 1998; Condie and Capecchi, 1993; Favier et al., 1996; Horan et al., 1995). Grafting experiments in the chick embryo indicates that this patterning is imparted before overt segmentation of the paraxial mesoderm into somites, likely during or shortly after gastrulation. In addition, *Hox* gene expression characteristic

of the initial axial position is retained in such transplants, consistent with a critical role for the *Hox* code in establishing A-P vertebral identity during this window (Kieny et al., 1972; Nowicki and Burke, 2000).

Considerable effort has been applied to the elucidation of the mechanisms by which *Hox* genes are regulated (Di Rocco et al., 2001; Gould et al., 1997; Marshall et al., 1996; Barna et al., 2000). Among such effectors, the vitamin A derivative retinoic acid (RA) plays a critical role (Marshall et al., 1996). RA can induce *Hox* genes in embryocarcinoma cells in a manner reminiscent of the normal temporal activation of *Hox* expression, with 3' genes from a given faisceau responding earlier, and to lower concentrations of RA, than more 5' members (Boncinelli et al., 1991; Simeone et al., 1990). In vivo, administration of exogenous RA to mouse embryos between E7.5 and E8.5 typically results in anteriorization of a number of *Hox* genes in a manner which correlates with posterior vertebral homeotic transformations (Conlon and Rossant, 1992; Kessel, 1992; Kessel and Gruss, 1991). Similar affects are also elicited by RA on expression of *Hox* genes in the CNS and concomitant perturbation of rhombomere patterning (Gavalas and Krumlauf, 2000; Gould et al., 1998; Marshall et al., 1992).

The RA signal is transduced by the RA receptors (RAR α , β , γ and their isoforms). RARs belong to the family of ligand-inducible nuclear receptors and regulate expression of retinoid target genes as heterodimers with a retinoid X receptor (RXR α , β , γ) partner. RXR-RAR heterodimers function by binding to cis-acting regulatory sequences (RAREs) present in the promoter region of target genes (Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1995; Losson, 1997). Consensus RAREs have been described which consist of direct repeats (DR) of the sequence PuG(G/T)TCA with 2 or 5 nucleotides intervening the repeats (a DR2 or a DR5 element, respectively). RAREs are, however, highly polymorphic, and a number of variant motifs have been described (Huang et al., 2002; Glass, 1996). Retinoid signaling is also tightly controlled by the opposing actions of RALDH2, which is essential for the

generation of most embryonic RA, and CYP26 members, which catabolizes RA (Swindell et al., 1999; Sakai et al., 2001; Abu-Abed et al., 1998; MacLean et al., 2001; Perlmann, 2002).

A role for endogenous retinoid signaling in affecting *Hox* expression and A-P patterning is supported by numerous studies (Gavalas et al., 1998; Huang et al., 1998; Zhang et al., 1997). Vertebral homeosis and hindbrain patterning defects, including altered *Hox* expression, are observed in a number of RAR null backgrounds, particularly RAR double null mutant (Lohnes et al., 1995; Lohnes et al., 1993; Dupe et al., 1999; Wendling et al., 2001). Patterning defects of a similar nature are also seen in both RALDH2 mutant embryos, which are essentially devoid of RA (Niederreither et al., 2000; Grandel et al., 2002) and CYP26A1 mutants, which have expanded fields of retinoid activity (Abu-Abed et al., 2001; Maden, 1999).

The above data demonstrate a clear relationship between retinoid signalling, *Hox* expression and A-P patterning of both neurectoderm and paraxial mesoderm. RA response elements (RAREs) have been described for a number of *Hox* genes, demonstrating that they are direct retinoid targets (Dupe et al., 1997; Marshall et al., 1994; Zhang et al., 1997; Frasch et al., 1995; Zhang et al., 2000; Oosterveen et al., 2003). However, gene targeting studies suggest that these RAREs are critical for directing *Hox* function in the hindbrain (Marshall et al., 1996; Gavalas et al., 1998; Nolte et al., 2003). While certain RAREs, such as the *Hoxd4* RARE, have been shown to affect expression of a transgenic reporter in the mesoderm (Zhang et al. 1997) the functional significance of this element has not been definitively established, and an RARE critical for directing *Hox* function in paraxial mesoderm has not been formally described. These data suggest that RA may regulate *Hox* expression in paraxial mesoderm either directly, through means such as the aforementioned RAREs, or indirectly; *Cdx* gene products (*Cdx1*, 2 and 4) (Gamer and Wright, 1993; Meyer and Gruss, 1993; Beck et al., 1995) are logical candidates for such an intermediary.

Cdx genes encode homeodomain transcription factors, and have been implicated as direct regulators of *Hox* expression (Charite et al., 1998; Isaacs et al., 1998; van Den Akker E. et al., 2002). Of particular relevance, *Cdx1*^{-/-} offspring display homeotic transformations of the axial skeleton reminiscent of defects seen in *RARα/γ* null mutants (Subramanian et al., 1995; Allan et al., 2001; Lohnes et al., 1994). We have found that *Cdx1* is responsive to excess RA and RAR ablation in vivo, and have documented a functional RARE that regulates expression in tissue culture (Houle et al., 2000). Taken together, these data strongly suggest that *Cdx1* is a direct RA target gene and may relay the retinoid signal to contribute to coordinated expression of *Hox* genes in the paraxial mesoderm.

To establish a more precise relationship between RA, *Cdx1*, *Hox* expression and vertebral patterning, we derived mice harbouring a functionally inactive *Cdx1* RARE. These RARE mutants exhibit normal onset of *Cdx1* expression at late gastrulation, although transcript levels were consistently reduced compared to wild type while expression at later stages was severely compromised. The RARE mutants also present with vertebral defects and altered *Hox* expression patterns which correlate with a subset of the *Cdx1* null phenotype. Although these data underscore a critical role for retinoid signalling in the regulation of *Cdx1* expression, we also found that *Cdx1* responded to exogenous RA in the RARE mutant background. Thus, as for several other known RA target genes, *Cdx1* may be regulated by several RA-dependent mechanisms.

Materials and methods:

ES cell culture and gene targeting. *Cdx1* sequences were isolated from a murine lambda phage genomic library. A 6 kb HindIII fragment encompassing the proximal *Cdx1* promoter, the entire first exon and part of the first intron, was subcloned into the KS+ plasmid. The RARE was subsequently disrupted by mutagenesis, and replaced with a unique Nru I site, using the Transformer Kit (Clontech). A bifunctional floxed thymidine kinase/neomycin resistance (PGK-TK-Neo) cassette (Iulianella and Lohnes, 2002) was subsequently ligated into the Nru I site, generating the targeting vector. R1 embryonic stem cells were cultured on feeder layers under standard conditions (Iulianella and Lohnes, 2002). Cells were electroporated with 30 µg of linearised targeting vector and selected with G418 (180 µg/ml) for 10 days. Clones were isolated and homologous recombination assessed by genomic Southern blot from replicate clones using Sac I digestion and hybridization with a 1 kb Sac I – Hind III fragment immediately 5' to the targeting sequences depicted in Fig. 1. Positive clones were further assessed for fidelity of recombination by Southern blot analysis following restriction with several different enzymes and hybridization with internal and external probes. Two clones were used to successfully generate germ line chimeras by blastocyst injection by standard methods (Hogan et al., 1994)

To determine if the disrupted RARE was functionally inactivated, DNA from the mutant allele (following Cre-recombination as described below) was amplified by PCR and subcloned into a *Cdx1*-reporter construct described previously (Houle et al., 2000). F9 embryocarcinoma cell transfection and luciferase assays were performed as previously described (Houle et al., 2000).

Animals and genotyping: F1 males from chimera-C57BL/6 crosses bearing the targeted allele were bred with homozygous female CMV-*Cre* mice (Dupe et al., 1997) and offspring assessed for excision of the floxed selection cassette by genomic Southern blot analysis following Eco RI digestion. All subsequent genotyping was performed by PCR using the

primers 5' GGTACACAATGCAACTCGGTG and 5' CCTCACACCCGCCACAG which flank the RARE. The wild type and mutant RARE allele can be distinguished by virtue of the increased size of the PCR product generated from the mutant allele following electrophoresis through a 2% agarose gel. The specificity of PCR analysis was further confirmed by Southern blot analysis of amplification products using oligonucleotide probes specific for wild type (5' GGTCACGACCCTTCGGGTCC) or mutant (5' CGAAGTTATCCCTGCTTATCG) products.

Lines derived from each ES clone were separately maintained in a 129Sv – C57BL/6 hybrid background. Skeletal defects, assessed as described previously (Allan et al., 2001), were identical with respect to expressivity and penetrance in both lines, and subsequent studies were conducted using only one mutant line. RARE homozygous mutants were crossed with both *Cdx1* null mutants and with *RAR γ* heterozygotes. In the former case, double heterozygous offspring were assessed for skeletal defects, whereas in the latter situation, *RARE*^{+/-}*RAR γ* ^{+/-} offspring were intercrossed, fetuses collected at term, genotyped and assessed for skeletal anomalies.

In situ hybridization and embryo culture. Embryos were harvested at E7.5 - E9.5, with noon of the day of detection of a vaginal plug considered as E0.5. Embryos were fixed overnight in 4% PFA at 4°C and processed for in situ hybridization as previously described (Allan et al., 2001). Embryos to be compared were processed in parallel to control for variation in signal intensity, and stage-matched according to established criteria. Probes for in situ hybridization were generated from previously described plasmids; *Hoxa3* (Manley and Capecchi, 1995), *Hoxb3* (Manley and Capecchi, 1998), *Hoxd3* (Condie and Capecchi, 1993), *Hoxa4* (Wolgemuth et al., 1987), *Hoxb4* (Folberg et al., 1999), *Hoxd4* (Featherstone et al., 1988) and *Cdx1* (Houle et al., 2000). Embryo culture, including cycloheximide and RA treatment, was carried out as described (Houle et al., 2000) using 15% FBS in DMEM equilibrated under N₂ containing 5% O₂ and 5% CO₂.

Results

Inactivation of the Cdx1 RARE

The *Cdx1* promoter contains an atypical RARE which resembles a palindromic thyroid hormone response element (Houle et al., 2000). In order to functionally inactivate this element, a *floxed* neomycin selection cassette was embedded in a mutated *Cdx1* RARE, yielding a targeting construct comprised of six kb of homologous genomic sequences. RI ES cells were electroporated with a linearized targeting construct, and replicate colonies screened for homologous recombination by Southern blot analysis as described in Materials and Methods (Fig. 1 and data not shown). Nine recombinants were identified, of 300 clones screened, which exhibited the anticipated restriction pattern predicted for homologous recombination (Fig. 1B and data not shown). Chimeras from two independent clones gave germ line transmission of the targeted allele. These offspring were subsequently crossed with homozygous CMV-*Cre* transgenic mice to affect excision of the selectable marker. PCR analysis (Fig. 1C and Materials and Methods) showed the predicted RARE mutant allele was represented in 50% of the resultant offspring, and all of these heterozygotes passed the mutant allele to their offspring at the predicted Mendelian ratio, consistent with highly efficient excision of *floxed* sequences.

Transfection assays were used to verify that the targeted mutation abrogated RA response. To this end, we used PCR to amplify Cre-recombined sequences spanning the mutated RARE and substituted these sequences in a reporter vector comprising 2 kb of *Cdx1* genomic DNA directing expression of a luciferase gene. This reporter (Lox mut in Fig. 2) was compared to the wild type construct and to another previously published RARE mutation (Mut in Fig. 2) which is not capable of RXR/RAR binding or RA response (Houle et al., 2000). In F9 embryocarcinoma cells, the wild type reporter was induced by 10^{-6} M RA, whereas both the lox mut and MUT reporters were unresponsive (Fig. 2). Thus, the targeted mutation appears to effectively attenuate retinoid regulation through this RARE.

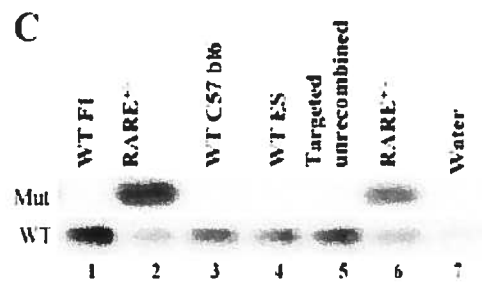
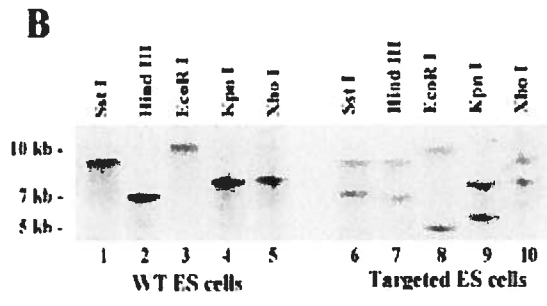
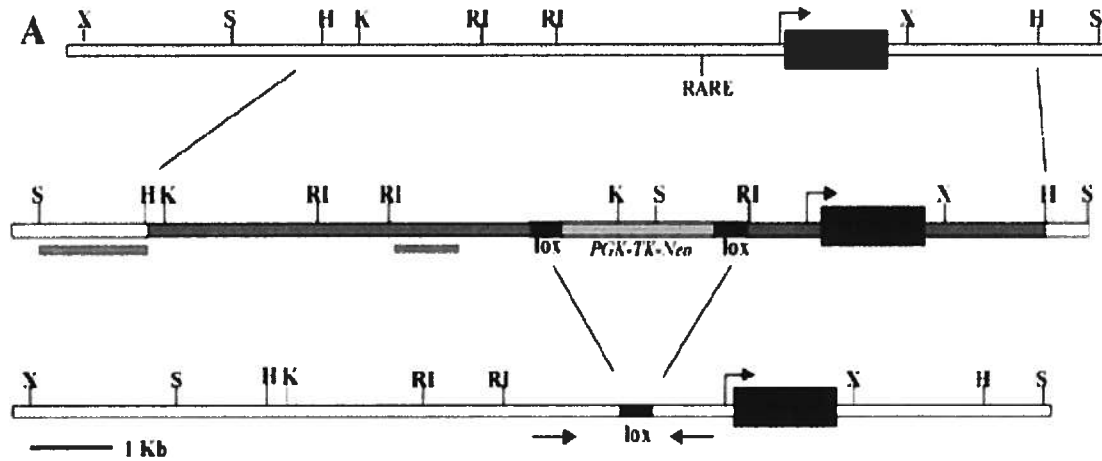


Figure 1.

Figure 1. Targeting of the *Cdx1* RARE. (A) Schematic representation of the 5' genomic region of *Cdx1* locus, targeted allele (targeting vector sequences shaded) and anticipated *Cre*-recombination product. The sequences external to the targeting vector used for screening initial recombinants are indicated below the targeted allele, as is the internal probe used to screen for *Cre*-catalyzed recombination. (B) A multi-enzyme Southern blot demonstration the predicted targeting event using the internal probe denoted in (A) with the restriction endonucleases utilized indicated above each lane. (C) Characterization of *Cre*-mediated recombination. Primers (arrows in A) were used to amplify over the RARE region by PCR. Products were resolved by agarose gel electrophoresis and characterized by Southern blot analysis using oligonucleotide probes specific for wild type or recombination products. As anticipated, the wild type (WT, lower panel) band is present in all samples with the exception of the negative control (lane 7), while the *Cre*-generated product is observed only in mice from the appropriate mating (lane 2) or from a cell line transfected with at *Cre* expression vector (lane 6). S, Sac I; H, Hind III; R, EcoR I; K, Kpn I; X, Xho I.

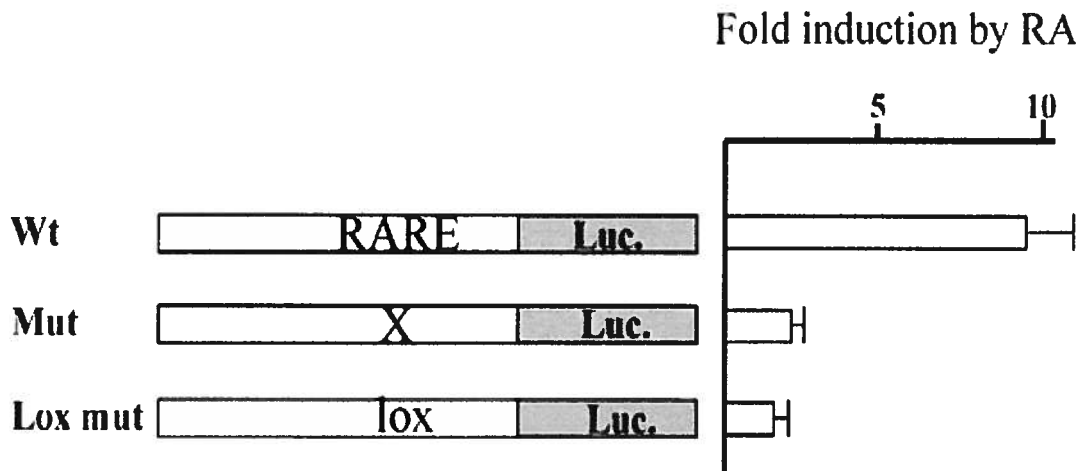


Figure 2. The targeted mutation of the RARE abrogates RA-response in tissue culture. F9 embryocarcinoma cells were transfected with 1.5 μ g of wild type (WT) *Cdx1* reporter, a reporter with a mutated RARE (Mut) or an RARE equivalent to the targeted mutation following Cre-mediated recombination (lox). Twenty-four hours following transfection, cells were treated with vehicle or 10⁻⁶ M RA and luciferase activity assessed twenty four hours post-treatment. Results, from independent triplicate experiments, were expressed as fold RA-induction relative to vehicle treated cells. Each transfection was repeated at least twice with similar results.

Disruption of the RARE affects Cdx1 expression.

Whole mount in situ hybridization analysis was used to compare *Cdx1* expression between wild type and RARE mutant embryos. *Cdx1* was undetectable until late primitive streak stages, when expression was initiated in both wild type and mutant embryos. However, at this stage transcript abundance was consistently reduced in mutant embryos relative to wild type controls (Fig. 3A versus 3B). At early somite stages, loss of expression was more pronounced in the RARE mutants compared to controls (Fig. 3D versus 3C) with expression subsequently nearly extinguished in mutants at later stages (Fig. 3F compared to 3E). In addition, expression of *Cdx1* in neurectoderm at E8.0 was also reduced in the RARE mutants, although the normal rostral boundary of expression was not affected (data not shown). These observations suggest that the RARE is critically required to establish normal levels of *Cdx1* expression from early stages onwards, and affects expression in both mesoderm and neurectoderm.

Evidence for additional retinoid pathways affecting *Cdx1* expression.

The targeted RARE mutation abrogates RA response of a *Cdx1* reporter in transfection assays in embryocarcinoma cells (Fig. 2). In order to determine if RARE null embryos were likewise unresponsive to exogenous RA in vivo, we treated pregnant females from E7.0 to E8.5 with vehicle or RA and harvested embryos 4 hours post-gavage. In wild type embryos treated on E7.0, *Cdx1* expression was induced marginally in earlier embryos, with more pronounced transcript abundance in late streak embryos (Fig. 4A and 4B). Notably, RARE mutants at this stage exhibited a similar profile of responsiveness (Fig. 4C and 4D), although expression levels were below that of controls in both untreated and RA-exposed mutants. A similar outcome was seen following treatment at E7.5 to E8.5, with both wild type (Fig. 4E,F,I,J,M and N) and RARE mutants (Fig. 4G,H,K,L,O and P) exhibiting induction at all stages assessed.

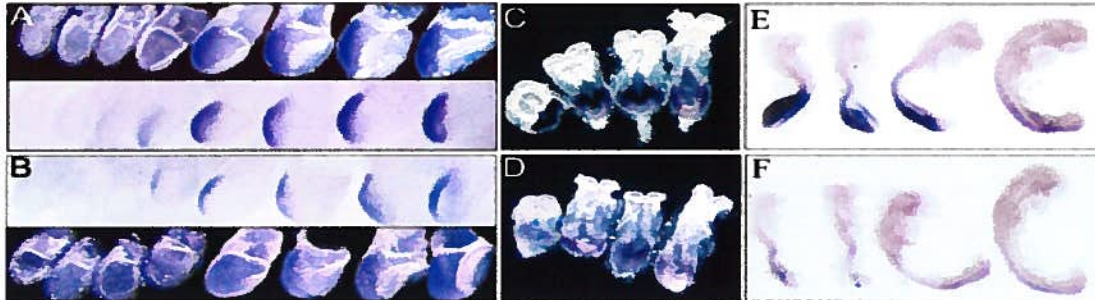


Figure 3. Loss of RARE function affects *Cdx1* expression in vivo. Whole mount in situ hybridization analysis of *Cdx1* expression wild type (A,C and E) and RARE mutants (B,D and F). All stages to be compared were processed and stained in parallel. (A,B) Analysis of early E7.0 to late head folds stages demonstrates onset of *Cdx1* expression at late primitive streak stages (E7.5) in both wild type (A) and RARE mutant embryos (B). Dark field micrographs are shown for ease of stage comparison. (C, D) Wild type (C) and RARE mutant (D) embryos ranging from 1 (left) to 7 (right) somites. Note the diminution of expression in mutant embryos relative to stage matched controls. (E, F) Wild type (E) and RARE mutant (F) embryos ranging from 7 (left) to 13 or 14 (right) somites. Note the near loss of expression in the mutants (F) relative to stage matched controls (E).

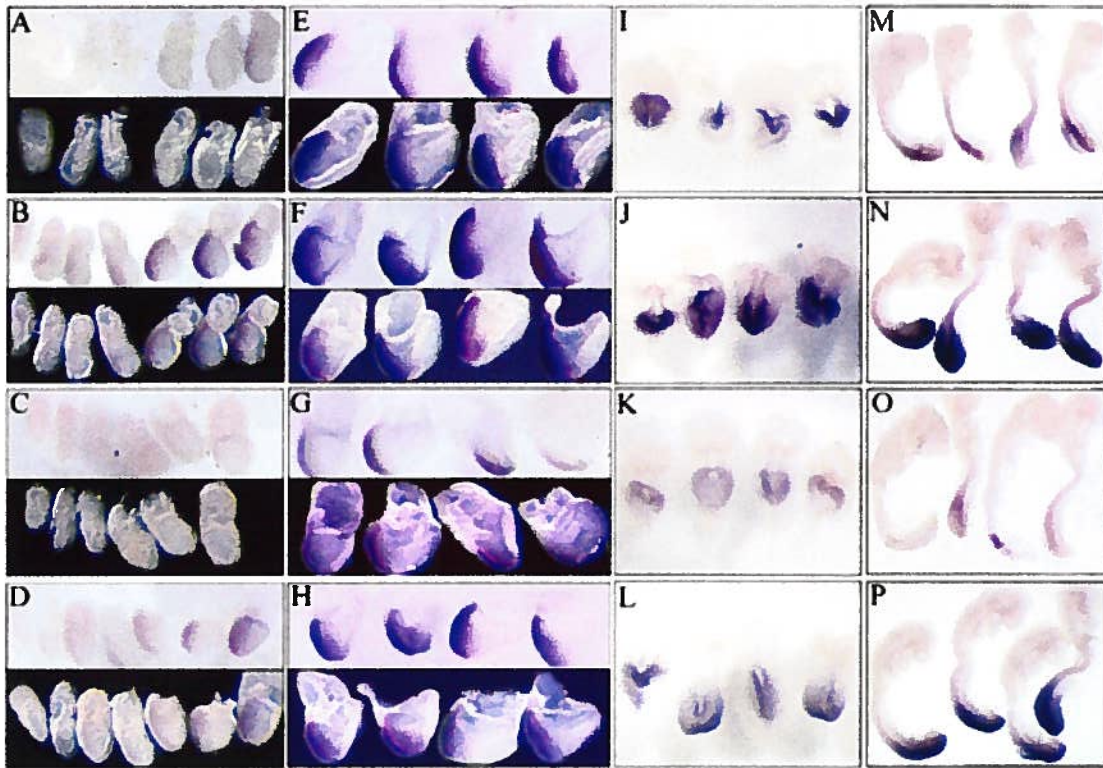


Figure 4. *Cdx1* is induced by RA in RARE null mutants. In situ hybridization analysis of *Cdx1* expression of wild type (A, B, E, F, I, J, M, N) or RARE^{-/-} (C, D, G, H, K, L, O, P) embryos following treatment with vehicle (A,C,E, G, I, K, M, O) or RA (B, D, F, H, J, L, N, P) at E7 (A-D), E7.5 (E-H), E8.0 (I-L) or E8.5 (M-P). All embryos were recovered 4 hours after *in utero* treatment with RA and equivalent stage matched samples processed in parallel for analysis). Note that *Cdx1* was induced by RA at gastrulation stages, with induction seen in both wild type (A vs. B) and RARE mutants (C vs. D). Induction also occurred at all later stages irrespective of genotype.

To determine if the effects of exogenous RA on induction of *Cdx1* in vivo was a secondary event, we used embryo culture to assess the effects of cycloheximide treatment on retinoid response. RA alone resulted in a pronounced induction of *Cdx1* in cultured RARE null embryos, with a magnitude of response comparable to that seen in vivo (Fig. 5B compared to 5A), while cycloheximide treatment alone had no significant effect (Fig. 5C versus 5A; the spurious staining seen in one cycloheximide-treated embryo is of unknown basis, and was not reproducible) (Houle et al., 2000). Cycloheximide also did not prevent induction of *Cdx1* by RA in the RARE mutant background (Fig. 5D compared to 5A), consistent with an additional, direct, means for RA-regulation of *Cdx1*.

RARE mutants exhibit vertebral homeotic transformations.

Cdx1 null mutant offspring exhibit vertebral homeosis and altered *Hox* gene expression. To determine if loss of the RARE affected any of these *Cdx1*-dependent functions, we compared skeletal patterning between wild type and mutant backgrounds. The murine axial skeleton is typically comprised of occipital bones, derived from condensation of the four rostral-most somites, and a vertebral column consisting of seven cervical (C1-C7), thirteen thoracic (T1-T13), six lumbar (L1-L6), three or four sacral (S1-S4), and over thirty caudal vertebrae. Many vertebrae exhibit distinct morphological features characteristic of their position along the A-P axis. The C1, or Atlas, exhibits broad neural arches and a medial ventral process, the anterior arch of the atlas (AAA). The second vertebra, C2, exhibits neural arches of intermediate size, and a second vertebral body, the dens axis that articulates with C1. C6 possesses two ventral anterior tubercles (TA), while the thoracic vertebra are distinguished by ribs, the first eight of which fuse with the sternum. T2 is also distinguished by the presence of a dorsal spinous process.

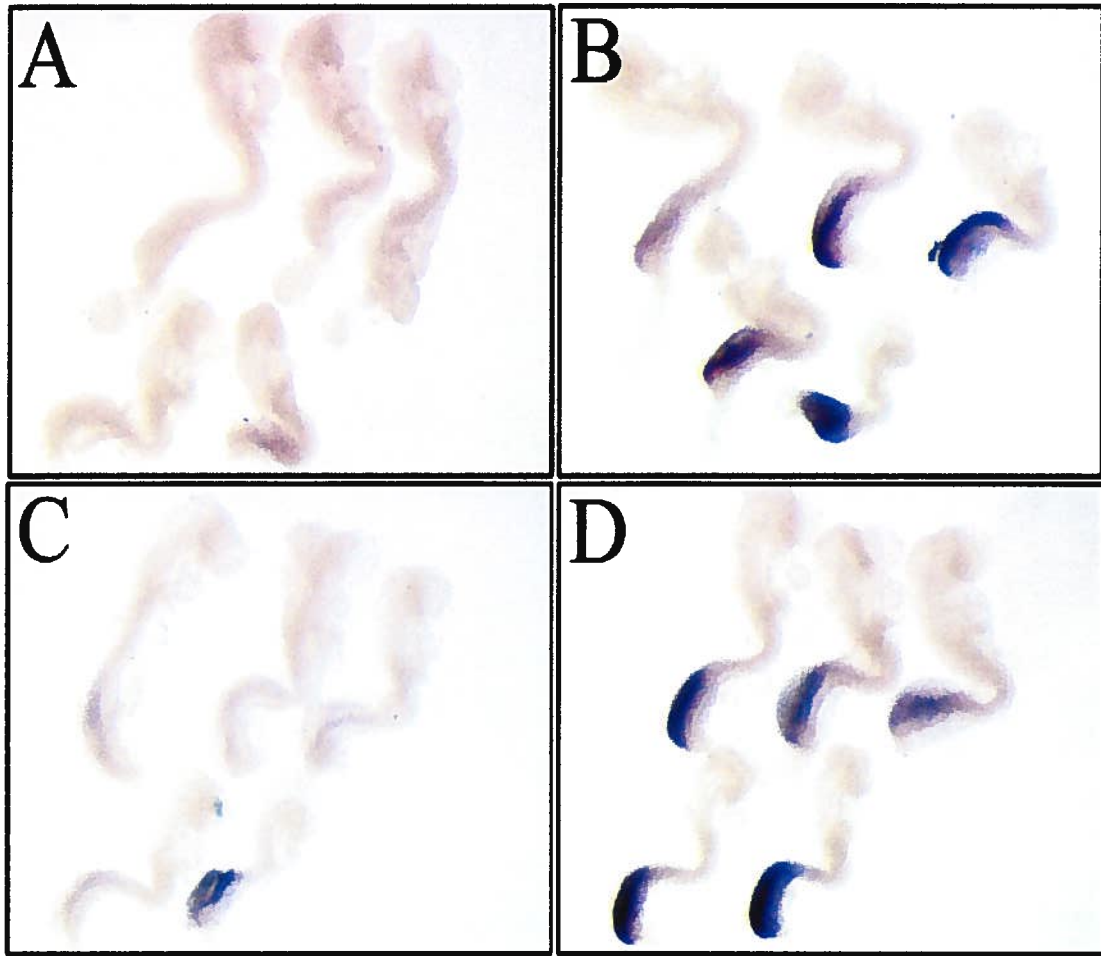


Figure 5. RA induction of *Cdx1* in RARE null mutants is independent of de novo protein synthesis. RARE null mutant E8.5 embryos were cultured for four hours with vehicle (A) 10^{-6} M RA (B), cycloheximide (C) or cycloheximide plus RA (D; all cycloheximide cultures were initiated 30 minutes prior to addition of RA). Note that cycloheximide did not prevent RA induction of *Cdx1* in the RARE null mutants (D vs B). The embryos are arranged to represent stage-matched samples between the four panels, with those on top possessing 8-12 somites, while those on the bottom having between 1-8 somites.

RARE heterozygous offspring exhibited a low incidence of defects affecting the first (C1) and second (C2) cervical vertebrae (Fig. 6B compare to control in 6A; Table 1). These consisted of a small posterior extension of the basioccipital bone, slightly narrower C1

neural arches and/or a short cartilaginous AAA on C2; the latter two defects are suggestive of a partial transformation of C2 to a C1 identity. In contrast, RARE homozygotes presented highly penetrant skeletal defects, with approximately 90% of all specimens examined exhibiting vertebral homeosis and/or other malformations. Defects typically consisted of partial C2 to C1 transformation, as evidenced by the presence of an ectopic AAA and/or broader neural arches on C2 (Fig. 6C and Table 1). Fusions between the AAA and the basioccipital bone, and/or narrow C1 neural arches were also observed, although at a lower frequency (Table 1). Interestingly, the RARE mutants were rarely affected posterior to the C2 (Table 1), although *Cdx1* null mutants are affected throughout the cervical and anterior thoracic skeleton (Subramanian et al., 1995).

Interaction between Cdx1 and RARE mutant alleles.

RARE null mutants exhibit a reduction in *Cdx1* expression and a subset of the vertebral malformations seen *Cdx1* null offspring. To further investigate these relationships, we assessed the phenotype of RARE^{+/-}*Cdx1*^{+/-} offspring relative to single RARE or *Cdx1* heterozygous and homozygous mutants (Fig. 6).

The incidence of vertebral defects exhibited variable sensitivity to RARE and *Cdx1* dosage along the axis. Malformations of C1, including reduced NA, enlargement of the basioccipital, or its fusion with the anterior arch of the atlas, were completely penetrant in the *Cdx1* null background, as described previously (van Den Akker E. et al., 2002; Allan et al., 2001; Subramanian et al., 1995). These defects were observed at a much lower frequency in *Cdx1*^{+/-}, RARE^{-/-} and RARE^{+/-}*Cdx1*^{+/-} backgrounds (Table 1). The partial C2 to C1 homeotic transformation is also completely penetrant in *Cdx1* null mutants and, in

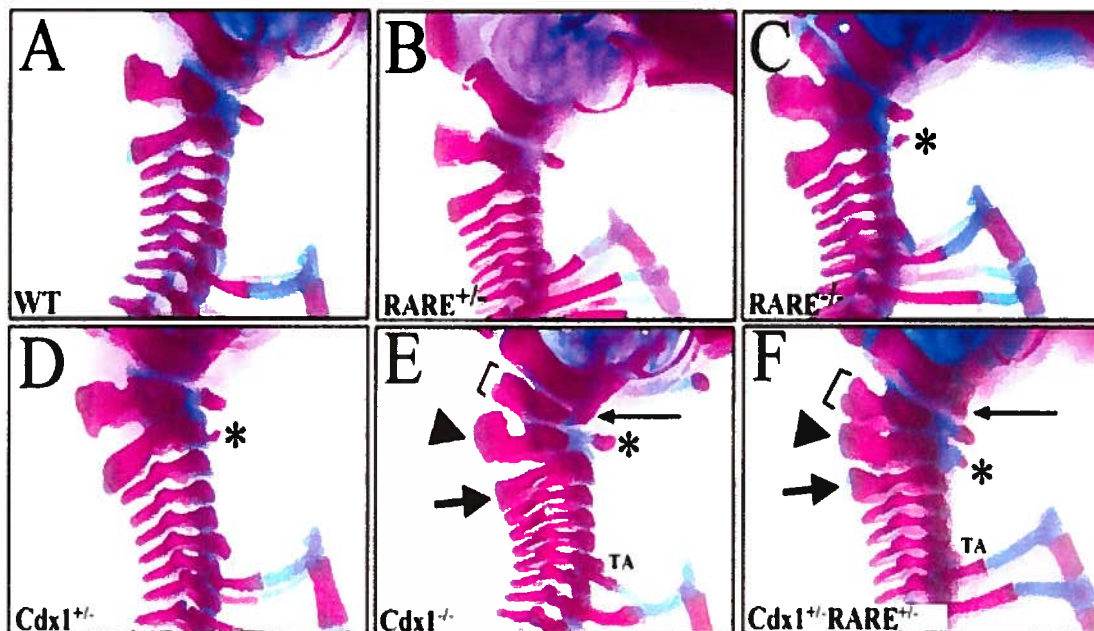


Figure 6. Skeletal defects in RARE and RARE-Cdx1 compound mutants.

Representative skeletal preparations from neonatal offspring; genotypes are indicated in each panel. Asterisk indicates ectopic anterior arch of the atlas (AAA) indicative of C2 to C1 transformation (C – F). Brackets (E and F) denote narrower than normal neural arches (NA) on C1, indicative of a transformation to an exoccipital-like structure, while the arrowhead and arrow (E and F) denotes a broader C2 neural arch, suggestive of C2 to C1 and C2 to C3 transformations, respectively. TA (E and F) indicate the anterior tubercles, normally found ventral to C6, that have been shifted posteriorly to the seventh cervical element. Thin arrow (E and F) indicates posterior extension of the basioccipital.

Table 1. Vertebral phenotypes of RARE, *Cdx1* and *Rarg* single and compound mutants

	<i>Rare</i> ^{+/+} (n=17)	<i>Rare</i> ^{-/-} (n=16)	<i>Cdx1</i> ^{+/+} (n=31)	<i>Cdx1</i> ^{-/-} (n=29)	<i>Rare</i> ^{+/+} <i>Cdx1</i> ^{+/+} (n=15)	<i>Rarg</i> ^{+/+} (n=38)	<i>Rarg</i> ^{-/-} (n=27)	<i>Cdx1</i> ^{+/+} <i>Rarg</i> ^{+/+} (n=10)	<i>Rare</i> ^{+/+} <i>Rarg</i> ^{-/-} (n=9)	<i>Rare</i> ^{-/-} <i>Rarg</i> ^{-/-} (n=16)	<i>Rare</i> ^{-/-} <i>Rarg</i> ^{+/+} (n=11)
Vertebra 1											
Malformed or fused to EO/BO; posterior extension of BO fused or not to AAA	2 (12)	(25)	(29)	(100)	5 (33)	-	(11)	(90)	3 (33)	6 (38)	5 (45)
Vertebra 2											
C1 features: broad NA/AAA	2 (12)	14 (88)	(56)	(100)	13 (87)	(8)	(41)	(100)	8 (89)	15 (94)	11 (100)
Vertebra 3											
Thick NA	-	-	-	(100)	5 (33)	-	-	(60)	1 (11)	4 (25)	4 (36)
NA fusions											
V1 to V4	-	-	(26)	(14)	5 (33)	-	-	(40)	1 (11)	5 (31)	8 (73)
TA on V7	-	-	-	(97)	5 (33)	-	-	-	-	-	1 (9)
Vertebra 8											
No rib	-	-	-	(38)	-	-	-	-	-	-	-
Vestigial/fused rib	-	1 (6)	-	(62)	1 (7)	-	-	-	-	-	-
Posterior spinous process											
V10 or V9+V10	-	-	-	(54)	3 (20)	(3)	(7)	(30)	-	3 (19)	3 (27)

Table 1. Vertebral phenotypes of RARE, *Cdx1* and *RARγ* single and compound mutants. Only abnormal phenotypes are indicated. Absolute numbers of skeleton with a particular phenotype are given with their relative percentage in bracket (%). Total amount of skeletons scored for each genotype is indicated on top of each column (n=).

contrast to C1 malformations, is observed at a high incidence in $RARE^{-/-}$ and $RARE^{+/-}$ $Cdx1^{+/-}$ offspring.

In contrast to more anterior elements, C3 was never affected in the $RARE^{-/-}$ or $Cdx1^{+/-}$ offspring, but exhibited C2 characteristics in all $Cdx1^{-/-}$ samples. Approximately one third of $RARE^{+/-}Cdx1^{+/-}$ offspring also exhibited this transformation. Similarly, transformation of C7 to C6, evidenced by ectopic anterior tuberculi, was absent in $RARE^{-/-}$ and $Cdx1^{+/-}$ offspring, but was completely penetrant in $Cdx1^{-/-}$ mice and observed at an intermediate frequency in $RARE^{+/-}Cdx1^{+/-}$ samples. These latter two transformations argue strongly that the $RARE$ mutation is allelic with $Cdx1$. Additional defects, including fusions between cervical neural arches, were also prevalent in $RARE^{+/-}Cdx1^{+/-}$ mutants, and may represent incomplete vertebral homeosis, as previously discussed (Allan et al., 2001).

It is interesting to note that the incidence of defects in both the $RARE$ null and $RARE$ - Cdx compound mutant backgrounds exhibited a variable frequency along the A-P axis; C1 and basioccipital appear to require minimal $Cdx1$ function, C2 being most sensitive, and more posterior cervical vertebrae exhibiting an intermediate level of sensitivity. This suggests a restricted window of function for the $RARE$, and by extension RA , in affecting $Cdx1$ expression and function.

Interaction between $RAR\gamma$ and $RARE$ mutant alleles.

To further investigate the relationship between $RARE$ -dependent Cdx function, RAR signalling and vertebral patterning, we assessed the skeletal phenotype of an allelic series of $RARE$ - $RAR\gamma$ compound mutants. $RAR\gamma^{+/-}$ offspring are essentially normal, whereas $RAR\gamma$ null mutants exhibit a low frequency of vertebral defects, the most prevalent being a partial C2 to C1 transformation, which is similar to the predominant malformation exhibited by $RARE^{-/-}$ mutants (Fig. 7B compare to 7A and Fig. 6C; Table 1). $RARE^{+/-}RAR\gamma^{+/-}$

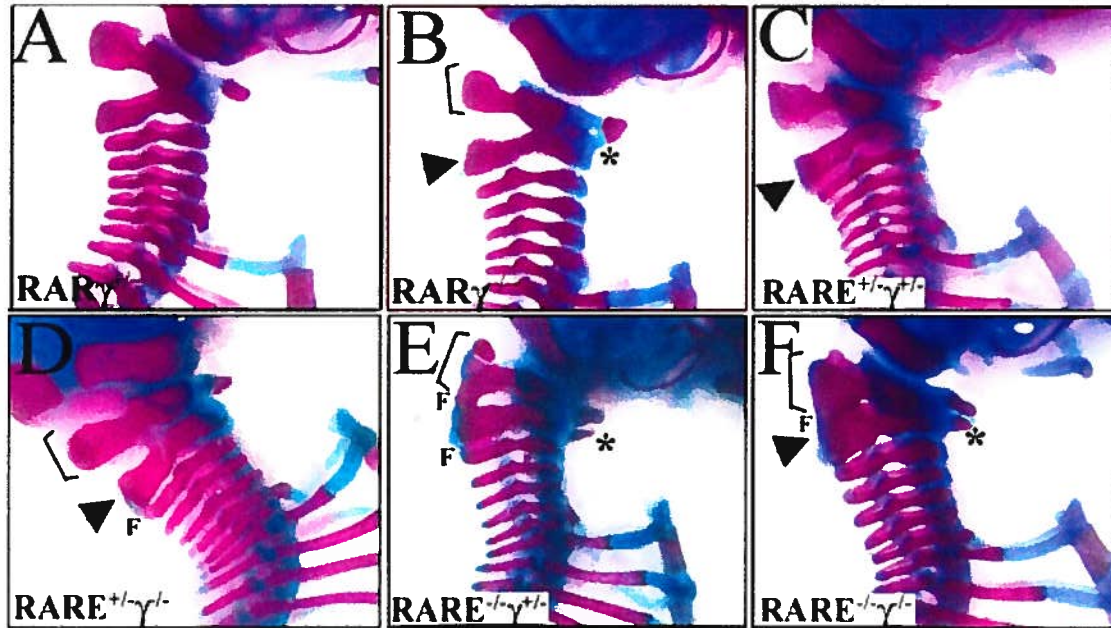


Figure 7. Skeletal defects in $RAR\gamma$ and $RAR\gamma$ - $RARE$ compound mutants.

Representative $RAR\gamma$ and $RAR\gamma$ - $RARE$ vertebral phenotypes with genotypes indicated in each panel. (B, D-F) Malformed neural arches on C1 are indicated by a bracket. (B-F) Widened neural arches on C2 are indicated by arrowheads while neural arch fusions between C1 and C2 or C2 to C3 are indicated by an F. (E, F) Ectopic anterior arch of the atlas associated with C2 is denoted by an asterisk.

mutants did not exhibit an increased incidence of vertebral malformations. In contrast, $RARE^{-/-}RAR\gamma^{-/-}$ double null offspring showed a marked increase in both the penetrance of defects characteristic of either mutant, as well as additional malformations not observed in either background (Fig. 7 and Table 1). Malformation of C1, including reduction of the neural arches, fusion of the AAA with the basioccipital bone or fusion of the neural arches of C1 and C2 were all observed at a higher incidence in the double mutant background in a manner suggesting a synergistic interaction between these alleles. The C2 to C1 transformation, which was incompletely penetrant in both $RARE^{-/-}$ and $RAR\gamma^{-/-}$ backgrounds, was observed in one hundred percent of the double null mutants. The C3 to C2 homeosis, which was absent in $RARE$ $RAR\gamma$ null backgrounds, was observed in $RAR\gamma^{-/-}RARE^{-/-}$ offspring, albeit with incomplete penetrance (Table 1 and data not shown). Consistent with these data, $RAR\gamma^{-/-}RARE^{+/-}$ and $RAR\gamma^{+/-}RARE^{-/-}$ offspring presented a range of malformations and degree of penetrance that were intermediate between the vertebral phenotype of $RAR\gamma^{-/-}RARE^{-/-}$ and $RAR\gamma^{+/-}RARE^{+/-}$ compound mutants (Fig. 7 D and E; Table 1). Taken together with our prior work (Allan et al. 2001), these findings suggest that retinoid-dependent vertebral patterning is affected by pathways involving both the Cdx1 $RARE$ and other RAR-regulated events.

***Hox* expression in *Cdx1* and *RARE* mutants.**

Both RA and Cdx1 have been shown to regulate the expression of certain *Hox* genes. Indeed, a number of the vertebral phenotypes observed in $RARE$ null or $RAR\gamma$ - $RARE$ compound mutants closely phenocopy the defects observed in certain *Hox* mutant mice (Manley and Capecchi, 1997; Horan et al., 1995). To further understand this relationship, we compared the effect of loss of Cdx1 or the $RARE$ on the expression patterns of *Hox* group 3 and group 4 genes by in situ hybridization.

In wild type E9.5 embryos, *Hoxa3*, *Hoxb3* and *Hoxd3* are all expressed with a rostral limit between the fourth and the fifth somite (Gaunt, 1988; Sham et al., 1992; Condie and

Capecchi, 1993), and null mutants of *Hoxb3* and *Hoxd3* phenocopy certain aspects of the *Cdx1* null phenotype (Manley and Capecchi, 1997; Condie and Capecchi, 1993; Allan et al., 2001; Subramanian et al., 1995). Consistent with this observation, the expression pattern of all three of these *Hox* genes was consistently posteriorized by one somite in *Cdx1*^{-/-} offspring (Fig. 8 and Table 2). In contrast, mutation of the RARE had not discernable effect on the pattern of expression of any of these transcripts. This suggests that although *Cdx1* plays a critical role in establishing the proper rostral expression of these group 3 genes, the RARE is not critically required for this function.

The expression pattern of *Hoxa4*, *Hoxb4* and *Hoxd4* was also examined. In wild type embryos, the anterior margin of *Hoxa4* distribution extends to somite 7, with somite 6 occasionally exhibiting weak expression (Horan et al., 1994; Gaunt et al., 1989). Expression of *Hoxb4* and *Hoxd4* was consistently observed with a rostral limit at somite 6, with weak expression in somite 5 sometimes seen (Fig. 9D and 9G). In the case of *Hoxa4*, somitic expression was not perturbed by disruption of either the RARE or of *Cdx1* (Fig. 9B and 9C). In contrast, *Hoxb4* was posteriorized from somite 6 to somite 7 in the majority of both *Cdx1* and RARE null offspring (Fig. 9E, 9F and Table 2), although residual expression was often observed in somite 6 in both mutant backgrounds. *Hoxd4* was also posteriorized by one somite in *Cdx1* null mutants, consistent with prior observations (van Den Akker E. et al., 2002). The majority of RARE mutants also displayed a comparable posteriorization of expression (Fig. 9H, I and Table 2). Again, weak residual staining was often detected in somite 6 in both mutant backgrounds. As summarised in Table 2, the altered pattern of *Hox* expression is consistent with the effect on skeletal patterning, with the RARE null mutants displaying characteristics similar to those of *Hoxb4* and *Hoxd4* null mutants. Similar correlations are also seen between *Cdx1* null mutants and *Hox* gene expression (Table 3).

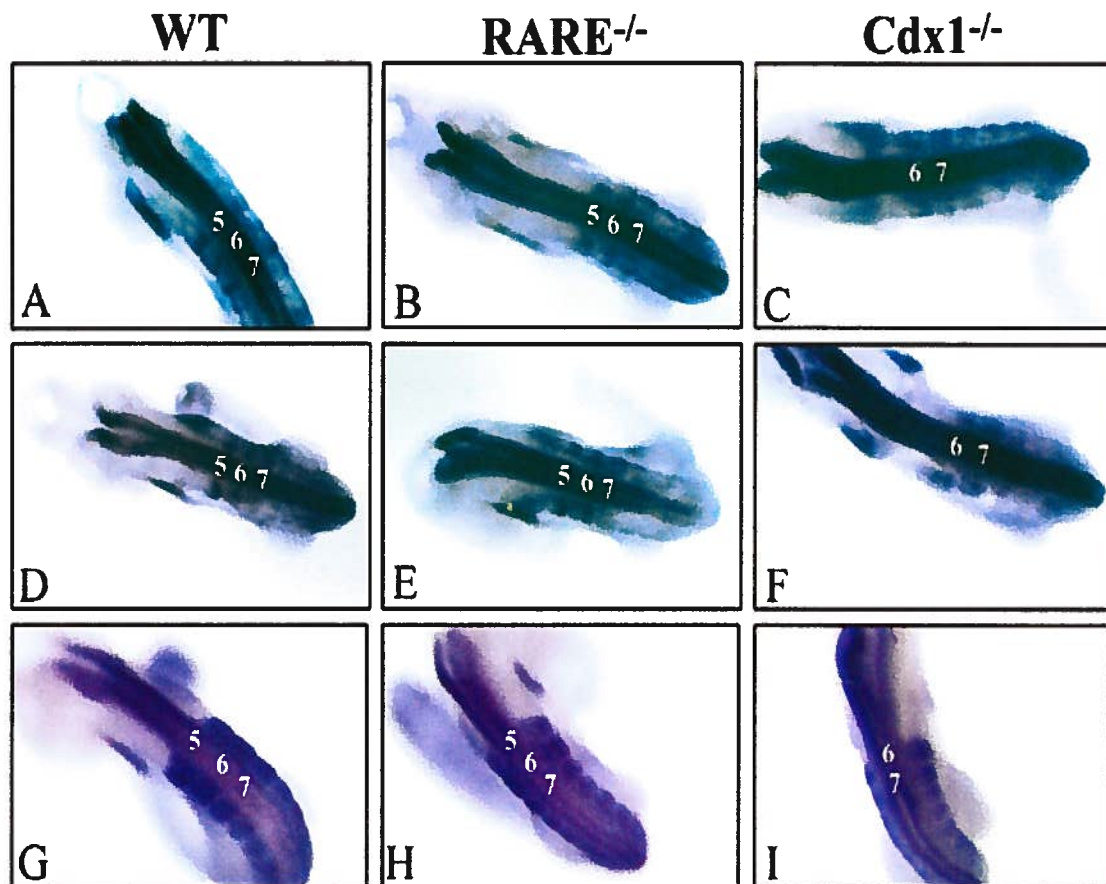


Figure 8. *Hox* paralog group three gene expression is altered in *Cdx1*, but not *RARE*, null mutants. (A, D, G) Wildtype, (B, E, H) *RARE*^{-/-} and (C, F, I) *Cdx1*^{-/-} specimens were assessed for expression of *Hoxa3* (A-C), *Hoxb3* (D-F) or *Hoxd3* (G-I) by whole mount in situ hybridization analysis. Somite number is indicated by numbering in each panel starting with the anterior-most limit of expression of each *Hox* gene. All three *Hox* genes were posteriorized by one somite in the *Cdx1*^{-/-} mutants (C, F and I) but were unaffected in *RARE* null samples (B, E and H).

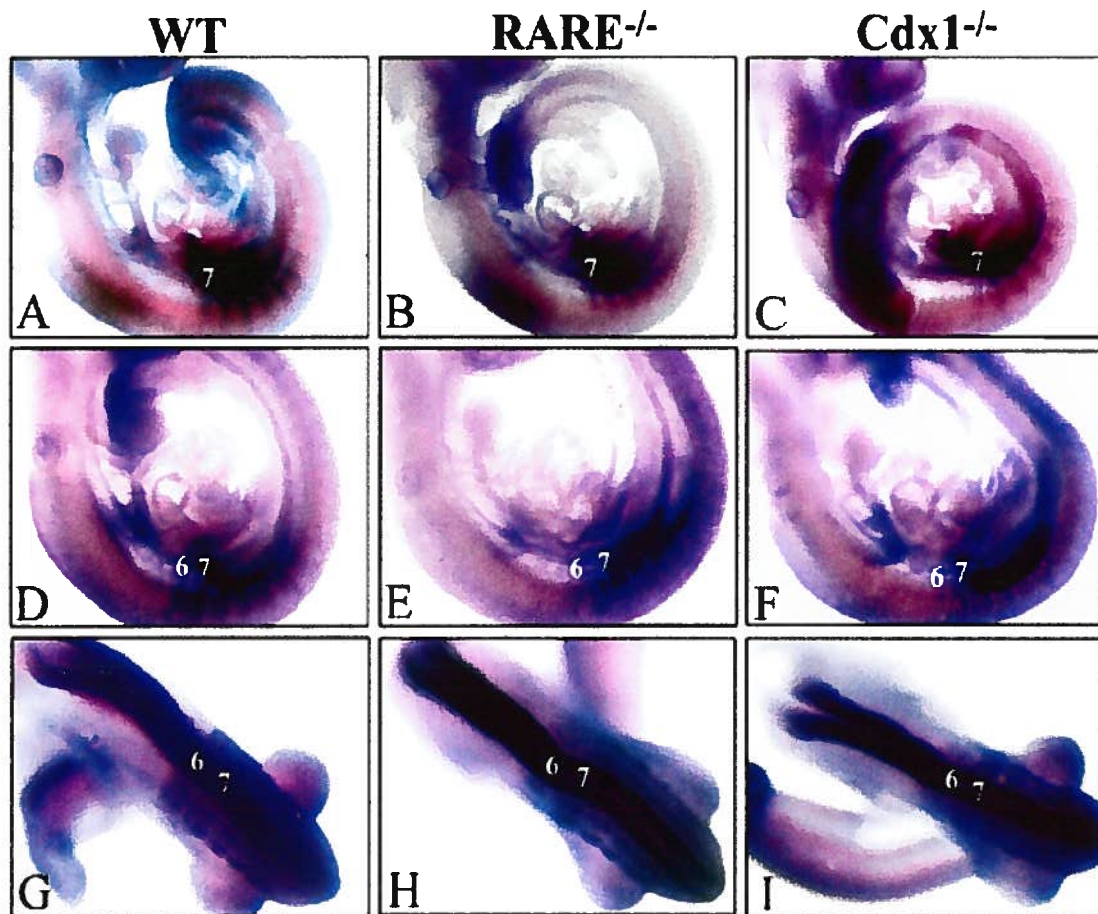


Figure 9. *Hox* paralog group four gene expression is altered in *Cdx1* and RARE null null mutants. *In situ* hybridization analysis of (A, D, G) wild type, (B, E, H) RARE^{-/-}, and (C, F, I) Cdx1^{-/-} specimens for *Hoxa4* (A-C), *Hoxb4* (D-F) or *Hoxd4* (G-I). Somite number is indicated in each panel commencing with the anterior-most limit of detection of each *Hox* gene. *Hoxb4* and *Hoxd4* exhibited similar posteriorization by one somite in both RARE (E and H) and Cdx1 (F and I) mutants while *Hoxa4* expression was unaffected (B and C). Note the low residual expression of *Hoxb4* and *Hoxd4* in somite 6 in both classes of mutants (E, F and H, I).

Table 2. Comparison of Hox gene expression between wild type, *Cdx1*^{-/-} and *Rare*^{-/-} embryos

Somitic anterior boundary	<i>Hoxa3</i> Somite			<i>Hoxb3</i> Somite			<i>Hoxd3</i> Somite			<i>Hoxa4</i> Somite			<i>Hoxb4</i> Somite			<i>Hoxd4</i> Somite			
	7	6	5	7	6	5	7	6	5	7	6	5	7	6	5	7	6	5	
Wild type			9/9			10/10			8/8	8/8					9/9			8/8	
<i>Rare</i> ^{-/-}			7/7			7/7			12/12	9/9			3/7	4/7				5/8	3/8
<i>Cdx1</i> ^{-/-}		6/6			6/7	1/7			3/3	8/8			6/8	2/8				6/7	1/7

Table 3. Comparison of RARE-, *Cdx1*- and Hox-null phenotypes

Mutant	Vertebral phenotype			
	BO/Vertebra 1	Vertebra 2	Vertebra 3	NA fusion
RARE	—	C2 to C1	—	—
<i>Cdx</i>	Always fused, reduced C1 NA and indistinct AAA	C2 to C1	C3 to C2	C2 and C3 fusion
<i>Hoxa3</i>	—	—	—	—
<i>Hoxb3</i>	—	—	—	—
<i>Hoxd3</i>	BO enlarged, indistinct AAA, deformed NA	Partial C2 to C1	—	—
<i>Hoxa3/d3</i>	Deletion of C1	—	—	—
<i>Hoxa3/b3</i>	BO fused to AAA, C1 NA reduced	Partial C2 to C1	—	—
<i>Hoxb3/d3</i>	Enlarged BO, deletion of whole C1	Partial C2 to C1	—	—
<i>Hoxa4</i>	—	—	C3 to C2	—
<i>Hoxb4</i>	—	C2 to C1	C3 to C2	C2 and C3 fusion
<i>Hoxd4</i>	Malformed C1 NA and BO, incomplete AAA	C2 to C1	Malformed NA	C2 and C3 fusion
<i>Hoxb4/d4</i>	Always fused, reduced C1 NA	C2 to C1	Partial C3 to C1	C2 and C3 fusion

Summary of the vertebral phenotypes observed in *Cdx1*-RARE, *Cdx1* and relevant Hox null mutants. RARE is from this study; other genes as follows (Subramanian et al., 1995; Chisaka and Capecchi, 1991; Manley and Capecchi, 1997; Condie and Capecchi, 1993; Horan et al., 1994; Ramirez-Solis et al., 1993; Horan et al., 1995). BO, Basioccipital; AAA, anterior arch of the Atlas; NA, neural arches; C1, C2 and C3, cervical vertebrae 1, 2 and 3.

Table 2 indicates how many embryos of each genotype had an anterior boundary of expression of group 3 and group 4 *Hox* genes corresponding to somite 5, 6 or 7. The denominator indicates the total amount of embryos scored for each genotype.

Discussion

Our prior work demonstrated that *Cdx1* is regulated by RA through an atypical RARE which functions at least in tissue culture models (Houle et al., 2000). The present study demonstrates a critical role for this regulatory element in governing *Cdx1* expression in vivo, and underscores a functional relationship between retinoid-dependent regulation of *Cdx1* and expression of a subset of those *Hox* genes normally dependent on *Cdx1*. The near-complete loss of *Cdx1* expression seen at later stages in RARE mutants also suggests that this element is essential for events related to *Cdx1* autoregulation (Prinos et al., 2001). Finally, this work also presents findings indicative of a second means for retinoid-dependent regulation of *Cdx1*.

The RARE is critical for Cdx1 expression

We chose to inactivate the *Cdx1* RARE by insertional mutagenesis, the end result of which was replacement of the RARE sequences with a *lox* site. This strategy was chosen in order to avoid unknown effects of *lox* insertion on sequences elsewhere in the locus, and to maximize the frequency of recovery of targeted clones. Indeed, targeting of *Cdx1* regulatory sequences using an unlinked selectable marker is much less efficient at this locus (N. Pilon and D.L., unpublished observation). An identical strategy to the present approach has been used previously to disrupt the *Hoxa1* RARE (Dupe et al., 1997).

The reduced *Cdx1* expression seen in the RARE null mutants could be due to non-specific effects due to the residual *lox* sequences, rather than due to disruption of the RARE per se, and such a possibility cannot be unequivocally ruled out. However, a number of observations suggest that the targeted disruption of the *Cdx1* RARE is both specific and obviates RA-response through this element. First, apart from the RARE, this region of the *Cdx1* promoter is poorly conserved between murine and human genomes (Houle et al., 2000), suggesting the absence of other conserved regulatory elements. Second, RARE null embryos initially exhibit a decrease in expression of *Cdx1* at E7.5. This effect is observed

in the primitive streak region, which is an active region of retinoid signalling at this stage (Balkan et al., 1992; Rossant et al., 1991). Finally, transfection assays demonstrated that the mutated RARE no longer mediates a retinoid response in tissue culture.

A role for the RARE in other Cdx1-dependent processes is also suggested by the finding that the null mutants exhibit reduced expression of *Cdx1* in the neurectoderm at E8.0. While this could occur through a reduction in initial expression at E7.5, RA is also found in the embryonic trunk at this stage (Rossant et al. 1991). The reduced expression of Cdx1 in RARE null offspring may therefore reflect a role for RA in directly regulating *Cdx1* in the neurectoderm per se. A similar retinoid-dependent mechanism has been suggested previously for *Hoxb4* gene expression in the neurectoderm (Gould et al. 1998). It should also be noted that, while a role for Cdx1 in the CNS is presently unknown, it is tempting to speculate that certain of the effects of RA on *Hox* expression in this lineage could be conveyed via Cdx1, and that the significance of this relationship may be masked by functional overlap with Cdx2 (van den Akker et al., 2002).

A second RA-dependent mechanism affecting Cdx1 expression.

The present study suggests the existence of a second pathway for RA induction of *Cdx1* which does not require the RARE and which is independent of *de novo* protein synthesis. While alternative mechanism cannot be ruled out, this observation is consistent with a second direct means for RA-regulation of *Cdx1* expression. This is not without precedent, as disruption of the *Hoxa1* RARE does not completely attenuate response of this gene to exogenous RA in vivo (Dupe et al., 1997). *Hoxb1* is also subject to regulation by multiple RAREs which function tissue-specifically (Huang et al., 1998). However, despite this selective function, certain of the *Hoxb1* RAREs can mediate response to exogenous RA in a non-specific manner. For example, disruption of the *Hoxb1* RARE which normally affects

hindbrain expression *in vivo* does not completely abrogate retinoid response in the neurectoderm, (Huang et al., 2002).

While the existence and identity of a second Cdx1 RARE is presently speculative, we have documented a DR5-like element in the distal Cdx1 promoter which can mediate RA-response in transfection assays in P19 embryocarcinoma cells (our unpublished observation). A putative DR2 RARE has also been described in first intron of both chick and mouse *Cdx1* loci which is necessary for a subset of expression in transgenic reporter assays (Gaunt et al. 2003). While more definitive analysis is necessary to confirm that either of these elements are bone fide RAREs, a second element would offer a basis for induction of Cdx1 by exogenous RA as seen in the RARE null mutants. Such a mechanism would also offer an explanation as to some of the discrepancies between our present findings and observations from transgenic models of *Cdx1* regulation (Lickert and Kemler, 2002). In these latter transgenic models, minimal *Cdx1* genomic sequences, (containing the proximal RARE mutated in the present study) were found to suffice to recapitulate most of the normal pattern of expression of *Cdx1*. Mutation of the RARE in this context severely affected expression at E7.5, much more so than the outcome of targeted ablation of this element presented here. As both the putative DR5 and DR2 elements are excluded from this transgenic promoter, they could potentially contribute to both early expression in the primitive streak and/or mediate the response of *Cdx1* to exogenous RA seen in the RARE null mutants.

The RARE is essential for maintaining *Cdx1* expression at post-gastrulation stages.

Previously, we had shown that *Cdx1* expression is compromised in RAR α 1-RAR γ double null mutants in the primitive streak region specifically at E7.5, while expression at E8.5 is unaffected relative to controls (Houle et al., 2000). This finding is in accordance with the distribution of bioactive retinoid signalling, which is robust in the primitive streak region at E7.5 but is absent at E8.5 and later in the tail bud (Balkan et al., 1992; Rossant et al., 1991).

Conversely, we (Prinos et al., 2001) and others (Ikeya and Takada, 2001), have suggested a role for Wnt signalling in affecting *Cdx1* expression at later (E8.5–E9.5) stages in the tail bud. Moreover, we have observed that loss of Cdx1 protein leads to eventual failure of *Cdx1* expression at E8.5, but not at earlier stages. This model (Prinos et al., 2001) suggests that RA specifically regulates early *Cdx1* expression, and that other mechanisms, including Wnt signalling and autoregulation, subsequently maintain expression at later stages.

While the above observations suggest an exclusive early role for retinoid signalling in regulating *Cdx1* in the caudal embryo, expression was severely compromised in RARE null mutants at E8.5 and later. One interpretation for this finding is that loss of the RARE may lead to a reduction of *Cdx1* expression below a critical threshold, resulting in subsequent failure of autoregulation. This observation also suggests that ablation of the RARE leads to a loss of greater than 50% of expression, as *Cdx1* heterozygous embryos do not exhibit such a compromise in late expression (Prinos et al., 2001). Such an interaction is not without precedent, as the *Hoxa4* RARE and an autoregulatory element genetically interact to maintain a similar loop (Packer et al., 1998). Alternatively, loss of expression at E8.5 may reflect a late, direct, role for the *Cdx1* RARE. Such a possibility, however, necessitates a ligand-independent mechanism, as retinoid bioactivity is excluded from the caudal embryo at this stage. In this regard, a role for unliganded RAR has been proposed in the development of both the appendicular skeleton and the anterior embryo (Weston et al., 2002; Koide et al., 2001), albeit in a repressor context. Finally, we cannot exclude the possibility that an effector other than the RARs may function through the RARE to maintain later *Cdx1* expression.

Vertebral defects in RARE null mutants.

RAR null mutants, in particular RAR α -RAR γ double mutants phenocopy certain of the vertebral malformations seen in *Cdx1* mutants (Lohnes et al., 1995; Subramanian et al., 1995b; Allan et al., 2001). The vertebral defects seen in RARE null mutants are also in

agreement with a critical role for RA in governing a subset of *Cdx1* expression and function. It is notable, however, that the vertebral defects in RARE null mutants were restricted to a subset of the rostral-most region affected by loss of *Cdx1*, while more caudal elements were not affected. As somites receive patterning information prior to their overt segmentation, the reduction of expression seen in RARE mutants at E8.5 and later does not appear to correlate with vertebral defects, which would be anticipated to occur at more caudal levels. This suggests that the RARE is essential for only a limited, early, function of *Cdx1*, and, conversely, that *Cdx1* is not critically required for A-P patterning at E8.5 and later stages. In this regard, *Cdx2* has been suggested to overlap functionally with *Cdx1* (van Den Akker E. et al., 2002; Charite et al., 1998; Marom et al., 1997), which may mask later roles for *Cdx1* in vertebral patterning. It is likewise possible that a second RARE precludes our understanding of the full scope of retinoid signalling on *Cdx1* expression and function.

We found that *RAR γ* and RARE null alleles interact on vertebral patterning. In particular, *RARE^{+/-}RAR γ ^{-/-}* mutants show high penetrance of the C2 to C1 transformation, as seen in *RARE^{-/-}* offspring. This is consistent with our previous finding that *RAR γ* and *Cdx1* synergize in vertebral patterning through *Hox* expression in a manner suggesting that retinoid signalling acts both upstream of, and parallel to, *Cdx1* (Allan et al., 2001). An alternative interpretation for the interactions seen between RARE and *RAR γ* null mutants is that loss of the receptor may affect *Cdx1* expression through the proximal RARE, and that a second putative RARE is not affected by the loss of this RAR. This possibility is supported by the phenotype of RARE-*RAR γ* double null mutants which is not reminiscent of *Cdx1^{-/-}* offspring as may have been anticipated if *RAR γ* impacts on *Cdx1* expression through multiple, equivalent, RAREs. Thus, it is conceivable that a second *Cdx1* RARE may be involved in tissue- or RAR-specific regulation, but is still capable of mediating a response to exogenous RA in paraxial mesoderm analogous to the differential functions of the *Hoxb1* RAREs (Huang et al., 2002). Alternatively, it is also possible that RARs can regulate *Cdx1*

expression through a second RARE, but such a role is not seen in RAR γ -RARE double null mutants due to functional redundancy among this receptor family (e.g. Lohnes et al. 1994).

The RARE is essential for a subset of Cdx1-dependent Hox gene expression.

Based on the nature of the vertebral defects observed in both Cdx1 and RARE null backgrounds, we investigated the expression of *Hox* genes from paralogue groups 3 and 4 as likely candidates for patterning defects at these axial levels. We found that all *Hox* group 3 genes assessed were posteriorized in Cdx1 null embryos, but were unperturbed in RARE null offspring. This finding is consistent with the more severe nature of C1 defects associated with both *Cdx1* and the respective *Hox group 3* null mutants (Allan et al., 2001; Chisaka and Capecchi, 1991; Manley and Capecchi, 1997; Condie and Capecchi, 1993).

While the expression of *Hoxa4* was not perceptibly altered in any background examined, the anterior limit of expression of both *Hoxb4* and *Hoxd4* was posteriorized by one somite in both Cdx1^{-/-} and RARE^{-/-} embryos. This is in close agreement with the phenotypes of these particular *Hox* null mice (Ramirez-Solis et al., 1993; Horan et al., 1995), which exhibit vertebral defects reminiscent of those seen in RARE null mutants (summarized in Table 3). Moreover, the frequency of posteriorized *Hox* expression in RARE null mutants is similar to the incidence of associated vertebral malformations. Taken together, these data suggest a direct relationship between retinoid signalling and Cdx1 function essential for establishing normal expression of these specific *Hox* genes.

It is notable that, while *Cdx1* null mutants exhibit altered expression of both *Hox* group 3 and group 4 genes, loss of the RARE affected only *Hoxb4* and *Hoxd4*. One possible basis for this observation is that *Cdx1* may not be affected at early stages by RARE disruption, and hence more rostrally-expressed *Hox* genes are not perturbed. We have not, however, noted such an effect, as *Cdx1* expression was uniformly reduced at onset in the RARE

mutants. Alternatively, it is conceivable that expression of *Hox* group 3 genes is reliant on a relatively low threshold of *Cdx1* protein, and this value is exceeded in RARE null mutants. Consistent with this, *Cdx1*^{+/-} offspring exhibit a higher frequency of vertebral defects associated with loss of expression of *Hox* paralogue group 4 genes, relative to group 3 members (Allan et al. 2001). This suggests that *Hox* genes exhibit differential sensitivity to *Cdx* dosage along the A-P axis, as previously discussed (Marom et al., 1997; Charite et al., 1998; Gaunt et al., 2003). It will be of interest to investigate *Cdx1*-dependent regulatory mechanisms governing expression of these particular *Hox* genes to determine if this is, indeed, the case.

A relationship between FGF, *Cdx* members and *Hox* expression has also been shown in *Xenopus* and the chick embryo (Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1996e; Bel-Vialar et al., 2002e), and it has been suggested that this pathway is important in establishing the expression domains of more 5' *Hox* gene paralogues, at least in the latter model (Bel-Vialar et al., 2002). This study also suggests a qualitative difference in *Hox* response to RA versus FGF, with more 3' paralogs responding to RA, but not FGF. We, and others, have also suggested a similar relationship between Wnt signalling, *Cdx1* expression, and vertebral patterning (Prinos et al., 2001; Ikeya and Takada, 2001). Based on these observations, it is tempting to speculate that *Cdx* members may play a general role in conveying posteriorization information from multiple signalling pathways to the *Hox* genes.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Peter Gruss and Barbara Meyer for the *Cdx1* null mice and *Cdx1* cDNA. Plasmids encoding sequences for in situ hybridization were kindly provided by M. Capecchi, D. Wolgemuth, M. Featherstone and P. Chambon. Suggestions from Dr. Mark Featherstone and members of the group are also gratefully acknowledged. We also wish to acknowledge Dr. Qinzhang Zhu and Michel Robillard for microinjection and Christian Charbonneau who was most helpful with photography. This work was supported by funding from the CIHR of Canada (#14412). M.H. is supported by a studentship from the CIHR of Canada, and D.L. by the FRSQ.

References

- Abu-Abed S., Dollé P., Metzger D., Beckett B., Chambon P. and Petkovich M.** (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* **15**, 226-240.
- Abu-Abed S. S., Beckett B. R., Chiba H., Chithalen J. V., Jones G., Metzger D., Chambon P. and Petkovich M.** (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J.Biol.Chem.* **273**, 2409-2415.
- Allan D., Houle M., Bouchard N., Meyer B. I., Gruss P. and Lohnes D.** (2001). RAR gamma and Cdx1 interactions in vertebral patterning. *Dev Biol* **240**, 46-60.
- Balkan W., Colbert M., Bock C. and Linney E.** (1992). Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 3347-3351.
- Barna M., Hawe N., Niswander L. and Pandolfi P. P.** (2000). Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat.Genet.* **25**, 166-172.
- Beck F., Erler T., Russell A. and James R.** (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev.Dyn.* **204**, 219-227.
- Bel-Vialar S., Itasaki N. and Krumlauf R.** (2002). Initiating *Hox* gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the *HoxB* genes in two distinct groups. *Development* **129**, 5103-5115.
- Boncinelli E., Simeone A., Acampora D. and Mavilio F.** (1991). HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.* **7**, 329-334.

Burke A. C., Nelson C. E., Morgan B. A. and Tabin C. (1995). *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**, 333-346.

Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940-954.

Charité J., de Graaff W., Consten D., Reijnen M. J., Korving J. and Deschamps J. (1998). Transducing positional information to the *Hox* genes: critical interaction of *cdx* gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* **125**, 4349-4358.

Chen F., Greer J. and Capecchi M. R. (1998). Analysis of *Hoxa7/Hoxb7* mutants suggests periodicity in the generation of the different sets of vertebrae. *Mech.Dev.* **77**, 49-57.

Chisaka O. and Capecchi M. R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* **350**, 473-479.

Christ B. and Ordahl C. P. (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol* **191**, 381-396.

Condie B. G. and Capecchi M. R. (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* **119**, 579-595.

Conlon R. A. and Rossant J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine *Hox-2* genes in vivo. *Development* **116**, 357-368.

Deschamps J. and Wijgerde M. (1993). Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev.Biol.* **156**, 473-480.

Di Rocco G., Gavalas A., Popperl H., Krumlauf R., Mavilio F. and Zappavigna V. (2001). The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the *Hoxb1* auto-regulatory enhancer function. *J.Biol.Chem.* **276**, 20506-20515.

Duboule D. (1998). Vertebrate hox gene regulation: faisceauing and/or colinearity? *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8**, 514-518.

Duboule D. and Dollé P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* **8**, 1497-1505.

Dupé V., Davenne M., Brocard J., Dollé P., Mark M., Dierich A., Chambon P. and Rijli F. M. (1997). In vivo functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**, 399-410.

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

Favier B., Rijli F. M., Fromental-Ramain C., Fraulob V., Chambon P. and Dollé P. (1996). Functional cooperation between the non-paralogous genes *Hoxa-10* and *Hoxd-11* in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* **122**, 449-460.

Featherstone M. S., Baron A., Gaunt S. J., Mattei M. G. and Duboule D. (1988). *Hox-5.1* defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 4760-4764.

Ferrier D. E. K. and Holland P. W. H. (2001). Ancient origin of the *Hox* gene faisceau. *Nature Reviews Genetics* **2**, 33-38.

Folberg A., Kovacs E. N., Huang H., Houle M., Lohnes D. and Featherstone M. S. (1999). *Hoxd4* and *Rarg* interact synergistically in the specification of the cervical vertebrae. *Mech.Dev* **89**, 65-74.

Frasch M., Chen X. and Lufkin T. (1995). Evolutionary-conserved enhancers direct region-specific expression of the murine *Hoxa-1* and *Hoxa-2* loci in both mice and *Drosophila*. *Development* **121**, 957-974.

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

Gaunt S. J. (1988). Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of *Hox-3.1* and *Hox-1.5*. *Development* **103**, 135-144.

Gaunt S. J. (1994). Conservation in the *Hox* code during morphological evolution. *Int.J.Dev.Biol.* **38**, 549-552.

Gaunt S. J., Krumlauf R. and Duboule D. (1989). Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, *-2.6* and *-5.1*, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* **107**, 131-141.

Gaunt S. J., Drage D. and Cockley A. (2003). Vertebrate caudal gene expression gradients investigated by use of chick *Cdx-A/lacZ* and mouse *Cdx-1/lacZ* reporters in transgenic mouse embryos: evidence for an intron enhancer. *Mech Dev* **120** 573-586.

Gavalas A. and Krumlauf R. (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **10**, 380-386.

- Gavalas A., Studer M., Lumsden A., Rijli F. M., Krumlauf R. and Chambon P.** (1998). *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* **125**, 1123-1136.
- Gehring W. J.** (1993). Exploring the homeobox. *Gene* **135**, 215-221.
- Gellon G. and Mcginnis W.** (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of hox expression patterns. *Bioessays* **20**, 116-125.
- Glass C. K.** (1996). Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J.Endocrinol.* **150**, 349-357.
- Gould A., Itasaki N. and Krumlauf R.** (1998). Initiation of rhombomeric *Hoxb4* expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* **21**, 39-51.
- Gould A., Morrison A., Sproat G., White R. A. and Krumlauf R.** (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping *Hox* expression patterns. *Genes Dev* **11**, 900-913.
- Grandel H., Lun K., Rauch G. J., Rhinn M., Piotrowski T., Houart C., Sordino P., Kuchler A. M., Schulte-Merker S., Geisler R., Holder N., Wilson S. W. and Brand M.** (2002). Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* **129**, 2851-2865.
- Hogan B., Constantini F., Lacy P. and Beddington R. S. P.** (1994). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Horan G. S., Ramirez-Solis R., Featherstone M. S., Wolgemuth D. J., Bradley A. and Behringer R. R.** (1995). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-*

4 genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* **9**, 1667-1677.

Horan G. S., Wu K., Wolgemuth D. J. and Behringer R. R. (1994). Homeotic transformation of cervical vertebrae in *Hoxa-4* mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 12644-12648.

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

Huang D., Chen S. W. and Gudas L. J. (2002). Analysis of two distinct retinoic acid response elements in the homeobox gene *Hoxb1* in transgenic mice. *Dev.Dyn.* **223**, 353-370.

Huang D., Chen S. W., Langston A. W. and Gudas L. J. (1998). A conserved retinoic acid responsive element in the murine *Hoxb-1* gene is required for expression in the developing gut. **125**, 3235-3246.

Ikeya M. and Takada S. (2001). Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech.Dev* **103**, 27-33.

Isaacs H. V., Pownall M. E. and Slack J. M. (1998). Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO J.* **17**, 3413-3427.

Iulianella A. and Lohnes D. (2002). Chimeric analysis of retinoic acid receptor function during cardiac looping. *Dev Biol* **247**, 62-75.

Kessel M. (1992). Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* **115**, 487-501.

Kessel M. and Gruss P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *Hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**, 89-104.

Kieny M., Mauger A. and Sengel P. (1972). Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev. Biol.* **28**, 142-161.

Koide T., Downes M., Chandraratna R. A., Blumberg B. and Umesono K. (2001). Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes Dev* **15**, 2111-2121.

Krumlauf R. (1994). *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.

Lickert H. and Kemler R. (2002). Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early *Cdx1* gene expression in the mouse. *Dev. Dyn.* **225**, 216-220.

Lohnes D., Kastner P., Dierich A., Mark M., LeMeur M. and Chambon P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643-658.

Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dollé P., Decimo D., LeMeur M., Dierich A., Gorry P. and Chambon P. (1995). Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 475-486.

Lohnes D., Mark M., Mendelsohn C., Dollé P., Dierich A., Gorry P., Gansmuller A. and Chambon P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723-2748.

MacLean G., Abu-Abed S., Dollé P., Tahayato A., Chambon P. and Petkovich M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, *Cyp26B1*, and comparative expression analysis with *Cyp26A1* during early murine development. *Mech. Dev* **107**, 195-201.

Maden M. (1999). Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays* **21**, 809-812.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and . (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.

Manley N. R. and Capecchi M. R. (1995). The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* **121**, 1989-2003.

Manley N. R. and Capecchi M. R. (1997). *Hox* group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev. Biol.* **192**, 274-288.

Manley N. R. and Capecchi M. R. (1998). *Hox* group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol.* **195**, 1-15.

Marom K., Shapira E. and Fainsod A. (1997). The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech. Dev* **64**, 41-52.

Marshall H., Morrison A., Studer M., Popperl H. and Krumlauf R. (1996). Retinoids and *Hox* genes. *FASEB J.* **10**, 969-978.

Marshall H., Nonchev S., Sham M. H., Muchamore I., Lumsden A. and Krumlauf R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain *Hox* code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* **360**, 737-741.

Marshall H., Studer M., Popperl H., Aparicio S., Kuroiwa A., Brenner S. and Krumlauf R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*. *Nature* **370**, 567-571.

- Meyer B. I. and Gruss P.** (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* **117**, 191-203.
- Niederreither K., Vermot J., Schuhbauer B., Chambon P. and Dollé P.** (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127**, 75-85.
- Nolte C., Amores A., Nagy K. E., Postlethwait J. and Featherstone M.** (2003). The role of a retinoic acid response element in establishing the anterior neural expression border of *Hoxd4* transgenes. *Mech. Dev.* **120**, 325-335.
- Nowicki J. L. and Burke A. C.** (2000). *Hox* genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* **127**, 4265-4275.
- Oosterveen T., Niederreither K., Dollé P., Chambon P., Meijlink F. and Deschamps J.** (2003). Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' *Hoxb* genes in posterior hindbrain. *EMBO J.* **22**, 262-269.
- Packer A. I., Crotty D. A., Elwell V. A. and Wolgemuth D. J.** (1998). Expression of the murine *Hoxa4* gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* **125**, 1991-1998.
- Perlmann T.** (2002). Retinoid metabolism: a balancing act. *Nature Genetics* **31**, 7-8.
- Phelan M. L., Rambaldi I. and Featherstone M. S.** (1995). Cooperative interactions between hox and pbx proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol. Cell Biol* **15**, 3989-3997.
- Pownall M. E., Tucker A. S., Slack J. M. and Isaacs H. V.** (1996). eFGF, Xcad3 and *Hox* genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* **122**, 3881-3892.

Prinos P., Joseph S., Oh K., Meyer B. I., Gruss P. and Lohnes D. (2001). Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev.Biol.* **239**, 257-269.

Ramirez-Solis R., Zheng H., Whiting J., Krumlauf R. and Bradley A. (1993). *Hoxb-4* (*Hox-2.6*) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* **73**, 279-294.

Roelen B. A., de Graaff W., Forlani S. and Deschamps J. (2002). *Hox* faisceau polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of faisceaued *Hox* genes in the mouse. *Mech.Dev.* **119**, 81-

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

Sakai Y., Meno C., Fujii H., Nishino J., Shiratori H., Saijoh Y., Rossant J. and Hamada H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* **15**, 213-225.

Sham M. H., Hunt P., Nonchev S., Papalopulu N., Graham A., Boncinelli E. and Krumlauf R. (1992). Analysis of the murine *Hox-2.7* gene: conserved alternative transcripts with differential distributions in the nervous system and the potential for shared regulatory regions. *EMBO J.* **11**, 1825-1836.

Simeone A., Acampora D., Arcioni L., Andrews P. W., Boncinelli E. and Mavilio F. (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* **346**, 763-766.

Subramanian V., Meyer B. I. and Gruss P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of *Hox* genes. *Cell* **83**, 641-653.

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

van den Akker A. E., Forlani S., Chawengsaksophak K., de Graaff W., Beck F., Meyer B. I. and Deschamps J. (2002). *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* **129**, 2181-2193.

Wendling O., Ghyselinck N. B., Chambon P. and Mark M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* **128**, 2031-2038.

Weston A. D., Chandraratna R. A. S., Torchia J. and Underhill T. M. (2002). Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. *J.Cell Biol.* **158**, 39-51.

Wolgemuth D. J., Viviano C. M., Gizang-Ginsberg E., Frohman M. A., Joyner A. L. and Martin G. R. (1987). Differential expression of the mouse homeobox-containing gene *Hox-1.4* during male germ cell differentiation and embryonic development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 5813-5817.

Zhang F., Nagy K. E. and Featherstone M. S. (2000). Murine *hoxd4* expression in the CNS requires multiple elements including a retinoic acid response element. *Mech.Dev* **96**, 79-89.

Zhang F., Popperl H., Morrison A., Kovacs E. N., Prideaux V., Schwarz L., Krumlauf R., Rossant J. and Featherstone M. S. (1997). Elements both 5' and 3' to the murine

Hoxd4 gene establish anterior borders of expression in mesoderm and neurectoderm. *Mech. Dev* 67, 49-58.

Chapitre 4 : Conclusion

4.1. *Cdx1* et la spécification vertébrale

Durant le développement des mammifères, l'établissement de l'axe AP se fait lors de la gastrulation avec la formation de la ligne primitive. C'est lors de leur passage au travers de cette structure, ou peu après, que les cellules adoptent leur identité moléculaire positionnelle le long de l'axe AP. Cette identité est facilement observable au niveau des dérivés du mésoderme paraxial qui se condensera en blocs de cellules le long de l'axe AP, les somites (Tam et al., 2000). De ces derniers naîtront, entre autres, les vertèbres dont la morphologie distincte permet de visualiser les altérations faites à leur identité positionnelle AP. Dans la ligne primitive, lors de la gastrulation, vers E7.25 se produit aussi l'expression initiale des gènes *Hox* les plus 3' des faisceaux. La combinaison de gènes *Hox* spécifiques (sur 39 connus) qui seront exprimés dans une cellule à sa sortie de la ligne primitive lui dictera l'identité positionnelle à occuper le long de l'axe AP. C'est le code *Hox*. L'altération, même transitoire, de ce code peut résulter en une transformation homéotique où un segment de l'axe va adopter l'identité d'un autre segment (Burke et al., 1995; Nowicki and Burke, 2000).

D'autres facteurs d'intérêt sont aussi présents lors du début de l'expression des gènes *Hox* les plus précoces dans la ligne primitive, dont l'acide rétinoïque (RA) et le facteur de transcription *Cdx1*. RA peut modifier le patron d'expression des *Hox* et ainsi altérer l'identité des vertèbres résultantes. Ceci se produit lorsqu'il est administré entre le jour E7.25 et E8.25 où RA cause une induction précoce et trop antérieure de certains *Hox* dont l'expression se trouve à être décalée rostralement. RA peut aussi modifier la morphologie de vertèbres sans apparemment affecter les *Hox*, mais uniquement quand il est administré à partir de E10.5 par un mécanisme incertain sur lequel nous ne nous attarderons pas davantage (Kessel and Gruss, 1991; Kessel, 1992). Une mutation de *Cdx1* chez la souris, ou de ses homologues, comme *pal-1* chez le *c.elegans* furent rapportés comme causant des

transformations homéotiques, de façon concomitante à un décalage postérieur dans l'expression de certains *Hox* (Subramanian et al., 1995; Waring and Kenyon, 1991).

4.1.1. Les malformations du knockout de *Cdx1*

Les phénotypes principaux des souris *Cdx1*^{-/-} sont les transformations homéotiques antérieures observées pour les vertèbres cervicales et thoraciques. Les malformations observées ressemblent à une combinaison de défauts présents chez les mutants pour divers gènes *Hox*. De façon consistante, l'expression de certains gènes *Hox* était décalée postérieurement d'un segment; parfois apparaissant comme un changement d'intensité d'expression dans certains segments plutôt que comme une disparition nette du segment en question. Ainsi *Hoxa7*, *c5*, *c6*, *c8* étaient postériorisés d'une prévertèbre chez les mutants *Cdx1* et l'expression de *Hoxd3* était décalée d'un somite vers la queue. Notons que ce décalage d'un seul segment semble suffisant pour causer des transformations typiques des mutants *Hox* nuls (Subramanian et al., 1995m).

Bien que le knockout de *Cdx1* ait été réalisé il y a presque une dizaine d'année et bien que *Cdx1* soit exprimé dans plusieurs autres tissus que le mésoderme paraxial, les mutations vertébrales sont le seul phénotype identifié chez ces mutants à date. Un retard dans la maturation des embryons chez ces mutants fut rapporté par un groupe (van Den Akker E. et al., 2002). Ce qui n'était pas observé dans nos colonies de souris *Cdx1*^{-/-}, laissant croire à des variations souches spécifiques auquel ce mutant est susceptible, comme rapporté précédemment (Allan et al., 2001; Subramanian et al., 1995). Pour ce qui est de l'absence de phénotype dans les membres et le tractus digestif, par exemple, il demeure possible que d'autres membres *Cdx* (2 ou 4) compensent pour l'action du *Cdx* manquant. Plusieurs autres organes et tissus demeurent à être observé attentivement chez ces mutants à la recherche d'un phénotype plus discret.

4.1.2. La redondance fonctionnelle des membres *Cdx*

L'une des possibilités à envisager est que tous les *Cdx* ont une fonction semblable et compensatoire. Bien qu'à l'extérieur de l'homéodomaine et de l'hexapeptide leurs séquences soient fort divergentes, il demeure possible qu'ils aient tous une fonction semblable de facteur de transcription et que les variations dans les phénotypes de leur knockout ne soient dues qu'à leur disparité d'expression spatio-temporelle. Ainsi *Cdx1* est présent dans la ligne primitive à E7.5 et entraîne des altérations vertébrales cervicales alors que *Cdx2* apparaît dans le bourgeon de la queue à E8.5 et cause des malformations thoraciques. Supportant cette théorie de fonction commune aux membres *Cdx*, l'on retrouve des transformations homéotiques plus prononcées chez les doubles mutants *Cdx1^{-/-}Cdx2^{+/-}*, de même qu'une expression de *Hoxd4* et *Hoxb9* qui est davantage décalée postérieurement que chez les simples mutants *Cdx1^{-/-}* (van Den Akker E. et al., 2002).

Les *Cdx* pourraient donc agir un peu comme les *Hox* du groupe 4 qui semblent tous avoir une fonction semblable et comme le phénotype des mutants du groupe 4, dépendre du nombre d'allèles restant plutôt que de quel membre est muté (Horan et al., 1995). De plus, des résultats *in vitro* démontrant que les divers CDX peuvent lier les mêmes CDRE (*CDX response elements*), notamment le CDRE du promoteur de *Hoxb8*. Ces études présupposaient que la quantité totale de *Cdx* formait un gradient AP responsable de l'établissement de l'expression des *Hox* selon un patron « en escalier » (Charite et al., 1998). Un tel gradient est supporté par la distribution des protéines et des mRNA des différents *Cdx* au moins chez la souris et le poulet (Gamer and Wright, 1993; Marom et al., 1997; Meyer and Gruss, 1993; Morales et al., 1996). De plus, une étude récente de transgénèse où le promoteur de *CdxA* du poulet fut utilisé pour diriger l'expression de *lacZ* chez la souris démontrait l'apparition d'un gradient AP dans l'activité du gène rapporteur (Gaunt et al., 2003). Un tel transgène suggère mais ne confirme pourtant pas que les *Cdx*, messagers et protéines, réagissent comme *LacZ* et soient distribués selon un gradient.

Un autre transgène qui pourrait être utilisé dans l'investigation de la redondance des *Cdx* serait un rapporteur pour les CDX. Le CDRE de *Hoxb8*, placé devant le gène de la

luciférase ou de *lacZ*, peut répondre aux différents *Cdx* en culture (M.H. non publié). Un tel transgène nous permettrait d'évaluer l'activité totale des CDX et dans quelle proportion cette activité est dépendante de chaque CDX, en l'utilisant dans des lignées *Cdx1^{-/-}*, *Cdx2^{-/-}* et *Cdx4^{-/-}* (mutants conditionnels en préparation dans le laboratoire). Finalement un tel transgène avec *lacZ* comme rapporteur permettrait de vérifier si la distribution des CDX totaux forme un gradient AP ou non. Cependant, il demeure possible que ce transgène présente un biais qui favorise son activation par l'un des CDX. Néanmoins, au-delà de la simple distribution de l'ARNm des *Cdx*, la distribution des formes actives de ces protéines doit être étudiée.

4.2. Les *Hox* chez les souris avec une activité CDX modifiée

Comme rapporté dans la section précédente et comme résumé dans l'introduction, plusieurs *Hox* sont affectés par l'inactivation génique de *Cdx1* et/ou *Cdx2* ou même du RARE de *Cdx1*. Leur expression dans le mésoderme est décalée postérieurement de un ou parfois deux segments, chez les doubles mutants (Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002; Charite et al., 1998). De plus, il fut démontré qu'un transgène où le promoteur de *Hoxb8* dirigeait l'activité de *lacZ* était postériorisé dans le mésoderme et le tube neural si l'on mutait ses CDRE. Il fut aussi rapporté qu'une souris surexprimant *Cdx4* sous le promoteur RAR β causait des malformations du tube neural et y antériorisait l'expression de *Hoxb8* endogène. Ces résultats rapportent donc une activité double des *Cdx*, non seulement dans le mésoderme mais aussi dans le tube neural. Finalement, ce rôle des *Cdx* neurectoderme fut aussi étudié par injection dans le tube neural d'embryons de poulet. Cette étude partageait les *Hox* en groupes 3' et 5' et montrait la susceptibilité, dans le tube neural, des groupes en 3' des faisceaux à être induit par RA et des groupes 5' par FGF. Cependant, alors que la réponse FGF dépendante demandait obligatoirement la présence des *Cdx*, l'induction dépendante RA des groupes 3' n'était pas affectée par un dominant négatif *Cdx* (voir la figure 4.2. pour un résumé) (Bel-Vialar et al., 2000).

Au sujet du rôle des *Cdx* dans le patterning du tube neural, spécifions que le modèle d'activation-transformation de Neuwkoop stipulait que le tissu ectodermal initialement activé à adopter une identité neurale antérieure (prosencephale) était par la suite transformé en un destin plus postérieur (rhombencéphale, moelle épinière) de façon graduelle le long de l'axe AP. Des signaux émanant du mésoderme, comme FGF, *Wnt* et RA en sont responsables (Nieuwkoop, 1999; Stern, 2001). Cependant des études plus récentes suggéraient que des signaux planaires se propagaient aussi le long du tube neural afin d'effectuer cette transformation. Les membres *Cdx* seraient donc d'excellents candidats pour jouer ce rôle de transformateur (Bel-Vialar et al., 2002; Conlon, 1995; Grapin-Botton et al., 1997).

4.3. À propos des *Hox*, du patterning vertébral et de la signalisation par RA et *Cdx*

En résumé, RA induit l'expression des gènes *Hox 3'* chez la souris mais l'action directe de RA sur ces *Hox 3'* ne fut démontrée nécessaire que pour leur expression dans le neurectoderme. L'importance d'une signalisation directe intacte de RA à ces *Hox 3'* demeurerait spéculative pour le tissu mésodermal. Par ailleurs, dans ce même mésoderme, l'expression de *Cdx1* est requise pour l'expression de certains *Hox 3'*, dont *Hoxa3*, *b3*, *d3* et *b4* et *d4* (Allan et al., 2001; Houle et al., 2003; Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002).

4.3.1. L'identification d'un RARE dans le promoteur de *Cdx*

Notre premier indice de l'importance *in vivo* de *Cdx1* comme médiateur de la signalisation des rétinoïdes aux *Hox* fut la découverte que RAR α γ sont requis pour l'expression normale de *Cdx1* dans la ligne primitive, berceau du mésoderme. Comme un décalage postérieur dans l'expression de certains *Hox* est associé à un défaut d'expression de *Cdx1*, ceci suggérait que les RAR nécessitaient l'action de *Cdx1* pour permettre l'expression normale de certains *Hox 3'* dans le mésoderme. Nous avons ensuite isolé, tout d'abord par essais de transfections, puis par essais de retards sur gels contigus, un élément de réponse à

RA qui était fort atypique; un élément palindromique inversé plutôt qu'un DR5 ou un DR2. Cet élément ressemble à celui que lie TR dans le promoteur de GH chez le rat et est aussi reconnu par COUP-TF1 (Glass et al., 1988; Houle et al., 2000; Kadowaki et al., 1995). Malgré sa séquence inhabituelle cet élément est conservé chez l'humain. De façon quelque peu inattendue une étude récente a rapporté que cet élément était absent de l'homologue de *Cdx1* chez le poulet, *Cdx-A*. Cependant, ce groupe a décrit un second élément qui pourrait possiblement compenser mais qui nécessite une étude plus approfondie (Gaunt et al., 2003).

On peut s'interroger sur la signification de cette non-conservation du RARE atypique de *Cdx1* chez son homologue de poulet *CdxA*. Nous pouvons imaginer un scénario où, soit cet élément est apparu plus tard dans l'évolution et est par conséquent retrouvé chez l'humain mais non chez le poulet, ou soit qu'il est apparu plus tôt dans l'évolution mais qu'il ne fut conservé que chez les mammifères.

Considérant le rôle de *Cdx1* dans le patterning vertébral, on peut s'interroger si la région cervicale du poulet, afin d'adopter une identité qui lui est propre pouvait requérir une expression de *Cdx1* différente de chez la souris. En effet, alors que les mammifères possèdent probablement tous (incluant la girafe et la baleine) sept vertèbres cervicales, la région cervicale des oiseaux est constituée de douze à vingt-cinq vertèbres. Cette variation espèce spécifique du nombre de segments contribuant aux différentes régions (cervicale, thoracique, lombaire etc...) le long de l'axe AP se nomme transposition (Burke et al., 1995). Il était peut être était nécessaire à la poule (d'un point de vu évolutionniste) de conserver des vertèbres cervicales en excès, ce qui pourrait être associé à une modification de l'activité *Cdx1* (*CdxA*). Ces transpositions sont le résultat d'une altération dans le patron d'expression de plusieurs *Hox*. Chez le python, dont la seconde vertèbre, tout juste postérieure à l'atlas, possède déjà des côtes, *Hoxc8*, typique du code *Hox* des vertèbres thoraciques, est exprimé jusque dans les somites les plus antérieurs. En contraste, chez la souris, la limite antérieure de *Hoxc8* correspond aux somites 17-18 (qui généreront des vertèbres thoraciques) et chez le poulet aux somites 23-24, justifiant le fait que la région

thoracique du poulet débute plus postérieurement, expliquant une région cervicale plus étendue (Burke et al., 1995; Tickle and Munsterberg, 2001). En relation directe avec les résultats présentés dans cette thèse, il est intéressant de constater que les deux *Hox* démontrés comme postériorisés chez la souris mutante pour le RARE de *Cdx1* (*Hoxb4* et *d4* du somite 6 au somite 7) ont une limite d'expression antérieure qui correspond à la même limite que chez le poulet (somites 7-8).

La mutation du RARE de *Cdx1* entraîne un décalage postérieur dans l'expression de certains *Hox*, ce qui serait consistant avec une augmentation du nombre de vertèbres cervicales. Cependant, alors que chez les mutants *Cdx1*, la première vertèbre thoracique est transformée en vertèbre cervicale, la première vertèbre cervicale disparaît et est fusionnée avec l'occiput résultant en un nombre de vertèbres cervicales normal. En somme, il est possible que la perte du RARE de *Cdx1* chez le poulet fasse partie du mécanisme de transposition, mais il n'en est pas le seul responsable et doit sûrement collaborer avec d'autres facteurs afin d'obtenir le patterning propre à la région cervicale du poulet.

4.3.2. L'interaction génétique entre RAR γ et *Cdx1*

L'importance de la relation RAR *Cdx1* fut confirmée par l'étude d'une série allélique de mutants *Cdx1* et RAR γ (Allan et al., 2001). Une synergie entre les deux phénotypes était très évidente et l'inactivation de tous les allèles de RAR γ et *Cdx1* menait à un décalage d'un segment tout le long de la colonne vertébrale cervicale, thoracique et lombaire afin de générer un squelette d'apparence presque normale. Ce phénotype était très frappant en comparaison avec les mutants où l'un des allèles de RAR γ ou *Cdx1* demeurait intact et qui présentaient une panoplie de fusions vertébrales, de fusions des côtes et de malformations difficiles à catégoriser. De plus, les mutants *Cdx1* nuls démontraient une résistance à l'induction de défauts causés par le traitement avec RA au jour E7.3, tel l'apparition d'un proatlas (vertèbre surnuméraire issue de la base du crâne). Ces résultats complexes

semblaient indiquer que RAR γ et *Cdx1* agissaient de façon à la fois convergente et linéaire sur le patterning vertébral (Allan et al., 2001).

4.3.3. L'inactivation du RARE de *Cdx1* endogène

Les expériences d'inactivation du RARE de *Cdx1* *in vivo* ont confirmé le rôle des RAR dans l'expression de *Cdx1*. L'expression de *Cdx1* dans ces mutants était plus faible que chez le type sauvage et ce de E7.0 à E9.5. Ces résultats contrastent avec l'expression de *Cdx1* dans les mutants RAR $\alpha1\gamma$, qui n'était atténuée qu'au jour E7.5.

Différentes explications sont à envisager pour expliquer cette différence. Premièrement, la diminution de *Cdx1* chez le mutant RARE est plus importante que chez le mutant RAR $\alpha\gamma$, abaissant le niveau de *Cdx1* sous un seuil où ce gène ne peut plus s'autoréguler. Deuxièmement, RAR $\alpha2$ réussit à prendre la relève au jour E8.5 chez les mutants RAR $\alpha1\gamma$ (ce qui présupposerait une variation dans les niveaux relatifs des types et isoformes des RAR à ce stade). Finalement, le RARE posséderait une fonction spécifique permettant le maintien de l'expression de *Cdx1* à E8.5-E9.5 par d'autres facteurs que les RAR.

Cette diminution constante du messager de *Cdx1* dans l'embryon RARE^{-/-} en développement est la cause d'un phénotype vertébral observé chez les nouveau-nés. Des transformations homéotiques antérieures sont observées au niveau des deux premières vertèbres cervicales. Ces phénotypes sont pratiquement absents des hétérozygotes, mais réapparaissent avec les mêmes fréquences chez les mutants RARE^{+/-}*Cdx1*^{+/-}. De plus, tout comme le mutant *Cdx1*, les mutants RARE synergisent avec les mutants RAR γ . Ainsi les transformations homéotiques de C1 et C2 sont plus fréquentes chez les doubles mutants que la somme des fréquences des simples mutants. De plus, ces transformations homéotiques antérieures s'étendent jusqu'à la troisième vertèbre cervicale, chez les doubles mutants, ce qui n'est jamais observé chez les mutants individuels (Houle et al., 2003). Ceci laisse supposer (de façon non exclusive et probablement concertée) que RAR γ et *Cdx1* affectent

des cibles communes ou que RAR γ diminue davantage l'expression de *Cdx1* chez le mutant RARE. Ce dernier point est consistant avec le second mécanisme de régulation directe de *Cdx1* par RA (comme discuté plus loin).

Ces études ont aussi révélé que l'expression de tous les membres paralogues du groupe 3 était postériorisée d'un somite chez les mutants *Cdx1*, mais pas chez les mutants RARE; *Hoxb4* et *d4* étant, eux, postériorisés tant chez les RARE que les *Cdx1*. Des corrélations intéressantes ressortent de ces observations. Premièrement, la région C1 et basoccipitale des mutants *Cdx1* était altérée comme dans certains mutants multiples des membres du groupe paralogue 3. Cependant, alors qu'il est souvent considéré que la mutation d'un *Hox* résulte en une modification du segment correspondant à sa limite antérieure d'expression et qu'un phénotype similaire peut être obtenu par la postériorisation de cette limite, ce n'est pas ce qu'on observe chez les mutants *Cdx1*^{-/-}. En effet, chez ces mutants, *Hoxa3*, *b3* et *d3* sont tous postériorisés d'un somite mais le triple knockout résulte en la disparition (agenèse) de l'atlas (C1), ce qui n'est jamais observé dans les mutants *Cdx1* (Allan et al., 2001; Manley and Capecchi, 1997; Subramanian et al., 1995). Deux explications possibles viennent immédiatement à l'esprit. Premièrement, la fréquence de décalage postérieur de ces *Hox* n'est pas toujours de cent pour cent et aucune hybridation *in situ* triple n'a été réalisé, laissant la possibilité qu'au moins un membre du groupe 3 soit toujours exprimé correctement même si les autres membres sont postériorisés, ou peut être l'expression de ces *Hox* tombe t-elle en deçà du seuil de détection par cette méthode. Ce qui pourrait expliquer la différence entre le triple knockout (*Hoxa3/b3/d3*) et le mutant *Cdx1*^{-/-}.

La seconde hypothèse est que ces *Hox* représentent un cas particulier et ont une fonction supplémentaire sans laquelle l'atlas ne peut être générée. En support d'un cas particulier, notons que des études semblables réalisées sur les groupes 4, 7 et 9 n'ont jamais entraîné d'agenèse vertébrale (Chen et al., 1998; Chen and Capecchi, 1999; Horan et al., 1995).

Nous devons aussi considérer le cas des *Hoxa4*, *b4* et *d4*. Notons que seul *b4* et *d4* sont postériorisés tant chez les *Cdx1* nuls que les RARE nuls. Cependant, ajoutons que la limite normale d'expression de ces deux gènes est antérieure d'un somite à *Hoxa4* et par conséquent, chez les mutants RARE, *Hoxa4*, *b4* et *d4* se trouvent à avoir la même limite antérieure. Les transformations homéotiques antérieures des mutants *Hoxb4* et *d4* sont retrouvées tant chez les mutants RARE que chez les mutant *Cdx1*, confirmant le rôle de *Cdx1* et de son RARE dans la régulation de ces *Hox*. Cependant, ajoutons que ces similarités sont encore plus marquées dans le cas des doubles mutants RARE/RAR γ , suggérant encore une fois une convergence de ces voies de signalisation. À cet effet, notons que *Hoxa4* et *b4* possèdent des RARE documentés, contrairement à *Hoxa3*, *b3* et *d3* et donc que seuls des gènes *Hox* ayant déjà été décrits comme possédant des RARE sont régulé par le RARE de *Cdx1*. Alternativement, l'aggravation du phénotype *Hox* groupe 4 nuls par la mutation de RAR γ en plus du RARE peut venir du fait que l'absence RAR γ serait susceptible de diminuer l'activité d'un second RARE dans le promoteur de *Cdx1* et ainsi d'exacerber son phénotype, quoique qu'à première vue ce n'est pas ce qui fut observé.

Voyons maintenant le second mécanisme par lequel RA peut activer *Cdx1*. Nos observations ont rapporté que malgré la mutation du RARE connu de *Cdx1*, ce dernier était toujours inductible par RA dans les mêmes proportions que le type sauvage, mais à des niveaux absolus inférieurs. Nous avons exclu certains mécanismes indirects en confirmant que cette induction se faisait même en bloquant la synthèse protéique *de novo*. Nous pensons donc que, comme c'est le cas pour d'autres gènes RA inductible tels *Hoxa1* et *b1*, *Cdx1* posséderait en fait plus d'un RARE (Dupe et al., 1997; Marshall et al., 1994).

Bien que les mutants RARE puissent toujours répondre au traitement exogène de RA, il est fort possible qu'un second élément puisse convoier cette réponse sans pour autant être impliqué dans le patterning vertébral. Des RARE tissus spécifiques, mais qui perdaient cette spécificité lorsque baignés dans des doses pharmacologiques de RA, ont déjà été décrits (Dupe et al., 1997). En support de cette hypothèse, notons que le phénotype des

mutants RARE ne devient pas plus semblable au phénotype de *Cdx1* nuls lorsque l'on mute RAR γ . Comme la mutation de RAR γ diminuerait aussi l'action d'un second RARE, l'expression de *Cdx1* en serait diminué et par conséquent ressemblerait davantage au mutant nul. Ce qu'on observe c'est que le double mutant RAR γ RARE ressemble davantage au mutant *Cdx1*^{+/-}/RAR γ et par conséquent les mutations apparentées à celles découlant de l'inactivation des *Hox* du groupe 4 comme discuté plus haut. Le phénotype des *Cdx1*^{-/-}/RAR γ ^{-/-} suggère aussi une fonction complémentaire de ces deux gènes sur le patterning vertébral car chez ces double mutants on observe un décalage antérieur dans l'identité des vertèbres tellement complet que son squelette s'apparente énormément à un squelette de type sauvage (Allan et al., 2001).

Alors que l'article du chapitre 3 était en révision un article rapportant l'identification d'un second RARE dans l'intron de *Cdx1* (et *CdxA*) fut publié. (Gaunt et al., 2003). La fonctionnalité de cet élément demeure à être confirmé mais supporte notre théorie, tout comme certaines transfections de fragments du promoteur distal de *Cdx1* devant luciférase qui sont inductibles par RA (Houle et al., 2003).

L'un des empêchements qui découle de ce second mécanisme d'induction de *Cdx1* par RA est la discrimination entre l'effet de RA sur les *Hox* directement ou *via Cdx1*. Nous aurions aimé présenter les résultats d'expression de différents *Hox* dans des souris traitées avec RA dans un contexte sauvage vs RARE muté afin de mettre en évidence un rôle indispensable de *Cdx1* dans l'induction de certains *Hox* par RA. Cependant, comme *Cdx1* est induit par RA malgré la mutation de son RARE, ce genre d'étude est malheureusement irréalisable.

4.4. Le rôle de *Wnt* dans la régulation transcriptionnelle de *Cdx1*

Les molécules solubles Wnt, dont Wnt3 induisent l'expression de leurs gènes cibles en permettant à un facteur cytoplasmique, β -caténine d'être transloquée au noyau et d'activer les facteurs de transcription LEF et TCF qui lient des séquences consensus dans le promoteur des gènes cibles. En absence de *Wnt*, donc de β -caténine nucléaire, LEF et TCF

sont associés à des cofacteurs répresseurs dont les homologues de *Groucho*, *Grg*. Ces répresseurs sont déplacés par β -caténine (Brantjes et al., 2001; Eastman and Grosschedl, 1999) afin d'activer la transcription.

L'importance de cette signalisation dans la formation du mésoderme est illustrée par la troncation caudale des mutants *Wnt3a* ainsi que chez les doubles mutants LEF1/TCF1. De plus, les mutants hypomorphe pour *Wnt3a*, *vt* (vestigial tail) présentent des transformations homéotiques révélant la fonction de *Wnt3a* non seulement dans la formation du mésoderme postérieur mais aussi dans son patterning (Galceran et al., 1999; Greco et al., 1996; Ikeya and Takada, 2001).

De façon consistante avec le rôle de *Cdx1* comme intégrateur de multiples signaux moléculaires du mésoderme caudal, deux éléments de réponse à LEF1 (LRE) ont été identifiés dans son promoteur. De plus, l'expression de *Cdx1* est compromise dans les souris *vt* aux jours E8.5-E9.5 dans le bourgeon de la queue, une région normalement riche en *Wnt3a* (Ikeya and Takada, 2001; Lickert et al., 2000; Prinos et al., 2001). Ceci suggère que la signalisation par *Wnt3a* est essentielle à l'expression normale de *Cdx1* (figure 4.2.).

4.4.1. Les sites LRE et la synergie *in vitro* de RA et *Wnt*

Les sites LRE du promoteur de *Cdx1* sont essentiels à l'induction des deux kilobases (kb) proximaux de ce promoteur avec *Wnt3a* ou avec une forme active fusion de LEF1 et β -caténine. De plus, les traitements combinés de RA et *Wnt3a* activent le rapporteur de deux kb du promoteur de *Cdx1* de façon synergistique. Cette synergie est dépendante de l'intégrité des sites RARE et LEF/TCF (Prinos et al., 2001). L'importance de ces sites fut également confirmée par transgénèse. Dans un promoteur de 0.7 kb qui récapitulait généreusement l'expression de *Cdx1*, la mutation du RARE prévenait l'induction du transgène à E7.5 (alors que cette réduction d'expression est beaucoup plus modeste dans le cas de la mutation du RARE endogène (Houle et al., 2003)). De plus, la mutation des sites

LRE empêchait le maintien de cette expression (Lickert and Kemler, 2002). Finalement, la mutation des sites LRE et du RARE entraînait l'abolition d'expression du transgène.

Un autre niveau de collaboration est celui de RA qui synergise aussi sur ce promoteur en présence de l'inhibiteur d'histones déacétylase TSA (trichostatine A). Comme RA et TSA synergisent sur ce promoteur, nous devons déduire qu'ils ont des fonctions différentes et complémentaires. Ainsi les RAR pourraient remodeler la chromatine et LEF, accompagné de β -caténine, pourrait induire d'autres changements comme l'acétylation des histones. Cette suggestion est supportée par l'inefficacité de la TSA d'activer le promoteur de *Cdx1* avec des LRE mutés. De plus, le fait que contrairement au traitement par RA, *Wnt3a* n'interagit pas de façon synergistique avec TSA supporte l'hypothèse selon laquelle TSA et *Wnt* auraient des effets semblables sur le promoteur de *Cdx1* (nos résultats préliminaires).

Finalement, des résultats préliminaires ont été obtenus au niveau du phénotype vertébral de souris mutantes pour les LRE ou à la fois pour le RARE et les sites LRE du promoteur de *Cdx1*. Les souris LRE mutantes avaient des défauts de C1 et de l'occiput, alors que les double mutants avaient un phénotype vertébral pratiquement identique à celui des souris *Cdx1* nulles (N. Pilon et D. Lohnes, non-publié). Des études d'expression de *Cdx1* et de certains gènes *Hox* viendront compléter ces résultats et peut-être confirmer que le rôle des LRE ainsi que la collaboration des LRE et RARE pour l'expression de *Cdx1*.

4.4.2. Les rôles et conséquences de l'autorégulation de *Cdx1*

Comme mentionné précédemment, certaines de nos études montrent que *Cdx1* doit s'autoréguler afin de maintenir son expression aux stades E8.5-E9.5. Le fragment de deux kilobases proximal du promoteur de *Cdx1*, placé devant le rapporteur luciférase, est activé de six fois lorsque cotransfecté avec un vecteur exprimant *Cdx1*. Pourtant cette région du promoteur ne contient pas d'élément de réponse à CDX (CDRE) suggérant que CDX1 utilisait un autre facteur qui lie son promoteur afin de pouvoir s'autoactiver (Prinos et al.,

2001). De façon consistante, notre laboratoire a démontré que *Cdx1* interagissait directement avec LEF1 sur le promoteur de *Cdx1* afin de permettre l'autoinduction. Non seulement ces sites sont-ils essentiels mais l'activation de la voie *Wnt* en elle-même est essentielle à cette autorégulation. Ainsi un rapporteur transfecté de façon stable dans des cellules F9, contenant deux kb du promoteur de *Cdx1* de type sauvage est inductible d'environ cinquante fois par RA. Si le site RARE seul est muté, aucune induction n'est observée (Prinos et al., 2001). Ce qui implique que *Cdx1* endogène, induit par RA, ne peut, à son tour, induire un rapporteur *Cdx1*-luciférase dont le RARE est muté.

Ceci peut sembler paradoxal avec l'induction de *Cdx1* endogène dans ces cellules suite au traitement par RA. Pourquoi le traitement avec RA n'entraîne-t-il pas l'activation de la voie d'autorégulation et indirectement celle du rapporteur? Encore ici, deux hypothèses sont possibles et non exclusives. Soit le RARE de *Cdx1* joue un rôle particulier dans son autorégulation, soit l'activation de la voie *Wnt* est essentielle et la présence de *Cdx1* dans le noyau n'induit pas l'autorégulation en absence de β -caténine. Ainsi, le traitement des transfectants stables dont le RARE était muté avec *Wnt3a* et RA permet un certain effet additif de ce dernier au-delà de l'effet de *Wnt* lui-même. Des essais d'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre LEF1 (étiqueté avec un épitope de hémagglutinine, HA) permettait de récupérer β -caténine et CDX1 lorsque la voie Wnt était active (M. Béland et N. Pilon, non publié). Cependant, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine avec un anticorps dirigé contre CDX1 (étiqueté FLAG) permis d'amplifier la région du promoteur contenant les LRE et ce en absence de *Wnt*, suggérant que ce facteur peut s'associer, de façon non productive, avec LEF sur le promoteur de *Cdx1* même lorsque la voie *Wnt* n'était pas activé (voire figure 4.1.).

Sans RA ni *Wnt*



Avec RA et *Wnt*

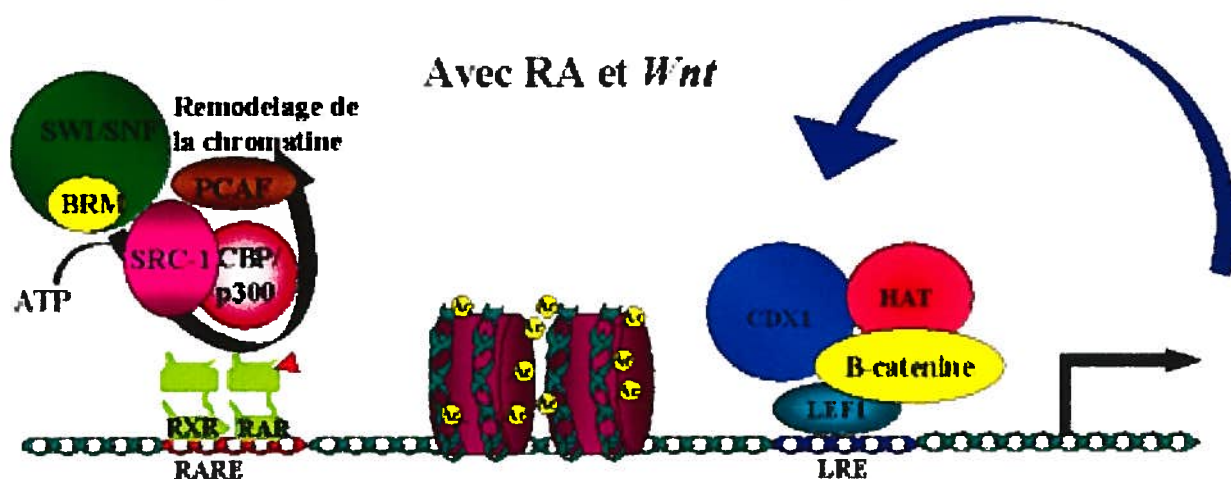


Figure 4.1. Activation du promoteur de *Cdx1* par RA et *Wnt*. En absence des ligand RA et *Wnt* les facteurs de transcription RAR et LEF1 agissent comme répresseurs transcriptionnels. L'activation de RAR par la liaison de son ligand entraîne possiblement un remodelage de la chromatine alors que l'activité de LEF1 associé à β -caténine acétylerait le promoteur pour favoriser la transcription. L'effet premier de *Wnt* est cytoplasmique et seul β -caténine qui agit comme second messenger est représenté. Les complexe DRIP/TRAP (non représentés) viendraient par la suite recruter les facteurs de machinerie transcriptionnelle de base (voir section 1.1.3.5.5). Ces mécanismes complémentaires d'activation de la transcription, soit le remodelage de la chromatine puis l'acétylation des histones, expliqueraient en partie l'activation synergistique de RA et *Wnt*. De plus, la présence de β -caténine permet à *Cdx1* d'activer son propre promoteur (la flèche bleue) via les sites LRE reconnus par LEF1, ce qui est également susceptible de contribuer à la synergie d'activation.

Il faut bien comprendre que la complexité de ce système le rend sujet à la surinterprétation. Ainsi, si l'on suppose que la synergie observée entre RA et *Wnt* a la même origine de base que celle entre RA et TSA (comparons des molécules solubles et non des facteurs de transcription) soit deux mécanismes d'activation de la transcription complémentaires, on peut s'attendre à obtenir alors une valeur maximale de *Cdx1* en présence de ces deux facteurs (surtout si l'on considère que ce sont les deux facteurs les plus importants pour l'expression embryonnaire de *Cdx1*). Ces résultats sont beaucoup plus marqués dans des essais de traitement sur des transfections stables du rapporteur de *Cdx1*, ce qui est normale vu l'importance de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle. Ainsi, dans des transfections stables, cette activation passe alors à plus de quelque dix mille fois.

Cependant il faut garder en tête que si l'activité des sites LRE, qui sont les sites d'action le plus en aval de *Wnt*, nécessitent une interaction physique entre LEF1 et *Cdx1* pour agir, la synergie observée entre RA et *Wnt* relève aussi du fait que RA (en plus de son effet sur les RAR dans le promoteur de *Cdx1* et le recrutement de coactivateurs) induise *Cdx1* endogène. En effet, les différents modèles de cultures cellulaires que nous utilisons pour modéliser le système embryonnaire (cellules souche embryonnaire ou de carcinomes embryonnaires, P19 et F9) se mettent à exprimer *Cdx1* très fortement lorsque mis en présence de RA. Donc personne n'a, à date, mesuré l'existence d'une synergie entre RA et *Wnt* dans un contexte où RA pouvait activer le promoteur de *Cdx1* mais sans que la protéine CDX1 ne soit synthétisée.

Certaines expériences sont à envisager pour étudier la question. Le modèle de culture, même à court terme, d'embryons de souris en combinaison avec la stabilité du messager mutant de *Cdx1* chez les *Cdx1* nuls, présentent une foule d'avantages appréciables. Ainsi en utilisant, par exemple, des embryons *Cdx1*^{-/-} avec *Wnt* et *Wnt* plus RA observe t-on toujours une synergie? Est-ce que TSA peut suppléer à *Wnt* dans ce système et est-ce que TSA plus *Wnt* plus RA amènent un niveau encore plus élevé de messager de *Cdx1*. En cours d'analyse dans notre labo sont des souris dont les LRE sont mutés. Chez des

embryons de cette lignée, quel est l'effet de Wnt, de RA plus Wnt, de TSA, plus ou moins RA plus ou moins Wnt? Ce sont plusieurs questions qui à mon avis aideront à définir le rôle spécifique de chacune de ces composantes dans le contrôle de l'expression de *Cdx1*. De plus, Ce système nous permet de contrôler les concentrations et temps d'exposition aux différentes molécules. Il est tentant de faire de semblables études avec le mutant RARE, mais l'induction résiduelle de *Cdx1* par RA rend probablement les variations du système trop subtiles pour être interprétées avec confiance.

4.4.3. Le rôle de FGF dans la régulation de *Cdx*

La fonction des membres de la famille *Caudal* *Cdx1* et *Cdx2* est aussi requise pour l'expression normale de certains *Hox* dans le neurectoderme, mais à ce jour uniquement des *Hox* davantage en 5' comme *Hoxb8* ou *b9* semblent être affectés dans le neurectoderme des mutants *Cdx* (1, 2, ou 1 et 2). En support à cette dernière observation, les *Cdx* sont aussi requis chez le poulet pour l'expression normale de ces *Hox* plus 5' dans le neurectoderme. Mais dans ce cas, ce n'est plus RA qui agit en amont de *Cdx1* mais bien FGF. Il semble donc qu'en ce qui concerne les *Hox* qui sont des cibles directes de RA et qui sont en 3' des faisceaux, *Cdx1* est essentiel à leur expression et est lui-même sous le contrôle de RA alors que pour les *Hox* plus 5', *Cdx1* est aussi important à leur expression mais il est sous le contrôle de FGF. Ces données sont rassemblées à partir de deux modèles différents, la souris et le poulet, mais de plus en plus d'évidences semblent confirmer que ce mécanisme serait valable dans plusieurs espèces (Bel-Vialar et al., 2002; van Den Akker E. et al., 2002).

4.5. Conclusions et perspectives

4.5.1. Le modèle

D'après les différentes données recueillies par notre laboratoire ainsi que plusieurs autres à travers le monde, il est possible de résumer chronologiquement les événements reliés à la fonction de *Cdx1* dans le patterning vertébral.

Tout d'abord, vers E7.5, dans la ligne primitive RA possiblement en collaboration avec *Wnt3a*, induit l'expression initiale de *Cdx1* et possiblement de plusieurs *Hox* situées en 3' des faisceaux (Deschamps et al., 1999; Houle et al., 2000; Ikeya and Takada, 2001; Lickert and Kemler, 2002; Prinos et al., 2001). Les cellules qui migrent à travers la ligne primitive sont exposées à RA à *Wnt3a* et à *Cdx1*. Le temps d'exposition de ces cellules dictera en partie quels *Hox* auront eu le temps d'être activés. Vers E8.5 cette expression des *Hox* dans les cellules est maintenue par l'action de la régulation croisée des *Hox* et l'action de *Cdx1*, *Cdx2* et de *Wnt*. *Cdx1* lui-même est sous l'influence d'un mécanisme d'autorégulation. *Cdx4* est également activé dans la partie la plus postérieure du bourgeon de la queue mais son rôle est encore incertain. L'activation de l'enzyme CYP26A1 entraîne la dégradation rapide de tout l'acide rétinoïque du bourgeon de la queue jusqu'au niveau des premiers somites. De façon consistante, l'absence de $RAR\alpha1\gamma$ n'affecte plus l'expression de *Cdx1* à ce stade. Cependant le traitement avec RA exogène peut encore amplifier et antérioriser l'expression de *Cdx1* avec des répercussions sur l'expression des *Hox*. Le rôle de *Cdx1* dans la réponse à RA exogène est de plus illustré par la résistance des mutants *Cdx1* à certains défauts induits par le traitement avec RA (Allan et al., 2001; Houle et al., 2003; Iulianella et al., 1999; van Den Akker E. et al., 2002). De plus, malgré l'absence de RA, les trois membres *Cdx*, ainsi que *Wnt3a* sont toujours en mesure d'induire l'expression des *Hox* plus 5' des faisceaux.

Au niveau du tube neural, les gènes *Hox* plus 3', qui sont les plus sensibles à RA ne semblent pas perturbés par l'absence de *Cdx1*, alors que les gènes plus 5' sont parfois postériorisés (comme *Hoxb8* et *Hoxb9*) (Houle et al., 2003; Simeone et al., 1990; van Den Akker E. et al., 2002). De façon consistante, chez le poulet, les gènes plus 5' répondent à la présence de FGF, non celle de RA, et l'action de FGF est dépendante de la présence de CdxA. Dans le tube neural, il semble donc que RA agisse directement sur les *Hox* 3', alors que dans le mésoderme, l'activité de RA sur les *Hox* 3' est, du moins en partie, *Cdx1* dépendante. Une hypothèse possible est que *Cdx1*, sous le contrôle de FGF agit comme agent caudalisant le long du tube neural en induisant les *Hox* plus 5' alors que RA utilise

Cdx comme inducteur des *Hox* plus 3' dans la ligne primitive et le mésoderme naissant. *Cdx2* semble agir de concert avec *Cdx1* dans ces deux tissus d'après le décalage plus sévère observé des *Hox* chez les doubles mutants *Cdx1/Cdx2* (Bel-Vialar et al., 2002; Deschamps et al., 1999; van Den Akker E. et al., 2002) (voir figure 4.2).

Il sera intéressant de confirmer si des rôles complémentaires de FGF et RA sur l'induction des *Hox* via *Cdx1* existent chez la souris. Finalement, nous espérons que les différents mutants et mutants multiples, *Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4* en préparation dans notre laboratoire sauront mettre en lumière le rôle de cette famille de facteur de transcription comme intégrateur de multiples signaux moléculaires gouvernant l'établissement de l'identité positionnelle le long de l'axe AP chez la souris.

4.5.2. Perspectives

Le patron d'expression des gènes *Cdx* va au-delà de leur expression embryonnaire dans le mésoderme paraxial et le tube neural. Les différents mutants que nous sommes en train de générer, tout comme ceux que nous avons déjà, sont susceptibles de révéler des rôles plus tardifs de ces molécules. La fonction de *Cdx2* sur le patterning AP du tube digestif a déjà été suggérée mais sa fonction exacte, de même que le rôle de *Cdx1* dans ce même tissu, demeurent inconnus. Aucun transgène utilisant des portions du promoteur de *Cdx1* n'a, à ce jour, été exprimé dans le tube digestif embryonnaire et cette répression n'a pas été étudiée chez l'adulte, démontrant que des régions de contrôle de l'expression de ce gène sont encore à découvrir (Beck et al., 1999; Beck et al., 2000; James et al., 1994; Lickert and Kemler, 2002).

De même, au niveau des membres, un rôle pour *Cdx1* reste à définir. Ainsi les membres sont normaux chez les mutant *Cdx1*, bien que les bourgeons des membres expriment *Cdx1* de façon transitoire. Un faible pourcentage de polydactylie chez les doubles mutants *Cdx1/Cdx2*, semble suggérer un rôle compensatoire de *Cdx1* et *Cdx2* dans les bourgeons des membres.

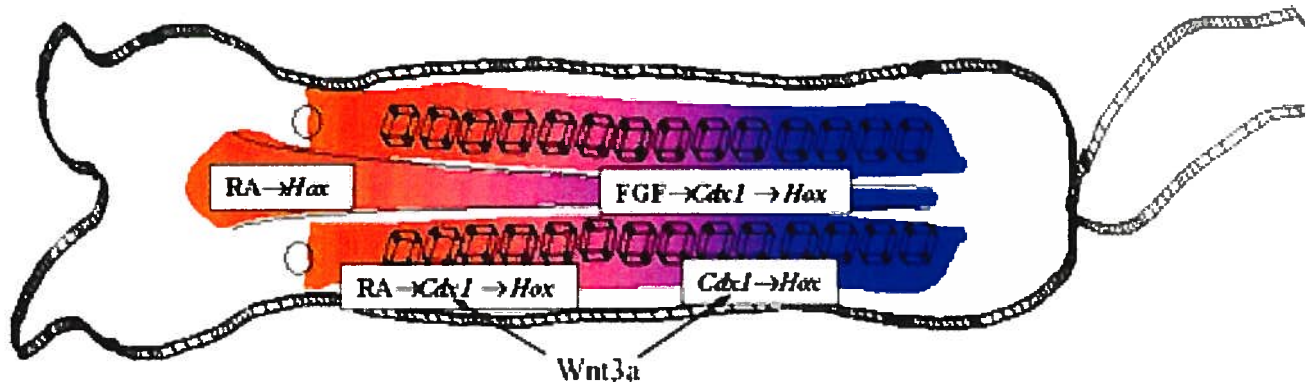


Figure 4.2. Résumé du rôle apparent de RA, FGF et *Cdx1* dans la régulation de l'expression des *Hox*. Les *Hox* plus 3' sont en orange Ces *Hox* sont en partie sous le contrôle direct de RA dans le tube neural antérieur et ne nécessitent pas l'intervention de *Cdx1* (RA→*Hox*). Ces mêmes *Hox* sont sous le contrôle de RA via *Cdx1* dans le mésoderme paraxial (RA→*Cdx1*→*Hox*). Les *Hox* plus 5' sont en bleu et sont régulés en partie par FGF via *Cdx1* dans le tube neural postérieur (FGF→*Cdx1*→*Hox*) et directement par *Cdx1*, sans que RA semble impliqué, dans le mésoderme paraxial postérieur (*Cdx1*→*Hox*). *Wnt* est impliqué dans la phase d'expression initiale de *Cdx1* (vers 7.5), dans l'expression caudale de *Cdx1* (E8.5) et dans son mécanisme d'autorégulation (E8.5-E9.5).

Curieusement, *Cdx2*, qui compenserait pour *Cdx1* dans le bourgeon des membres des mutants *Cdx1* ne fut lui-même jamais détecté dans ce tissu (Beck et al., 1995; Subramanian et al., 1995; van Den Akker E. et al., 2002). Ces tissus méritent donc plus d'études afin de bien comprendre en quoi *Cdx1* est impliqué dans son patterning.

Un autre aspect important associé à la régulation des *Hox* par *Cdx* est l'hématopoïèse. Le tissu sanguin est souvent omis lors d'études de patrons d'expression, peut-être vue la complexité du système. Ainsi aucun des membres *Cdx* ne fut décrit comme présent ou absent des cellules hématopoïétiques adultes. Cependant, les îlots sanguins du sac vitellin vers le jour embryonnaire 9.5, de même que l'allantois d'où proviennent les précurseurs hématopoïétiques embryonnaires, expriment *Cdx*. *Cdx4*, lui, n'est pas exprimé dans les îlots sanguins naissant, mais est cependant présent dans des cellules mésodermes de l'allantois et de la ligne primitive postérieure qui sont positives pour *SCL* (un marqueur de différenciation hématopoïétique) (Davidson et al., 2003; McGrath and Palis, 1997). De plus, une altération de l'expression des *Hox* fut souvent associée à des variations dans la prolifération et la différenciation de ces cellules, voir même à certaines leucémies. Finalement, le mutant spontané nommée *Kgg*, chez le poisson zèbre, implique une mutation de l'homologue de *Cdx4* et révèle des défauts d'hématopoïèse et une altération du patron des gènes *Hox* (Antonchuk et al., 2002; Davidson et al., 2003; Thorsteinsdottir et al., 1997; Thorsteinsdottir et al., 2002). Ceci constitue tout un champs d'intérêt jusqu'alors inexploré dans les fonctions des membres *Cdx* et qui mériterait certainement qu'on s'y attarde.

Finalement, une dernière question à se poser est pourquoi le RARE de *Cdx1*, au cœur même de cette thèse, possède-t-il une séquence si atypique conservée chez l'humain? Dans quel ordre y retrouve-t-on les RAR est RXR qui s'y lient? Peuvent-ils efficacement lier coactivateurs et corépresseurs? Plusieurs recherches ont démontré qu'afin que les RAR/RXR associés à RA puissent médier l'activation transcriptionnelle de leurs cibles, ils doivent avoir une conformation précise. Ainsi, leur liaison sur des DR1 plutôt que des DR2 ou DR5 inverserait l'ordre de liaison RXR/RAR et les incapaciteraient à transactiver. Les

RAR/RXR sur cet élément palindromique activent-ils vraiment leur cible, ou la liaison par le ligand ne fait-elle que déréprimer la transcription et amène le dimère RAR/RXR à un niveau neutre? (Predki et al., 1994).

Cet élément module t-il d'une façon particulière la réponse à RA? Permet-il la compétition par d'autres facteurs qui pourraient lier cette séquence passe-partout (comme RAR, ER, TR, RXR ou COUP-TF (Glass et al., 1988; Houle et al., 2000; Kersten et al., 1997a; Kliewer et al., 1992a))? Cet élément pourrait-il avoir différents rôles dans différents tissus? Ainsi la liaison de TR sur cet élément est également possible. Pourtant les récepteurs thyroïdiens n'apparaissent, au cours du développement, qu'après que *Cdx1* ait joué son rôle dans le patterning vertébral. Se pourrait t-il qu'au niveau du colon adulte, TR utilise ce même élément afin de réguler l'expression de *Cdx1* dans ce tissu. De façon consistante à ce modèle, les mutants pour certains types de TR ont des défauts de prolifération/différentiations des cellules du colon et présentent une diminution de l'expression de *Cdx1*. Finalement, T3 (ligand pour TR) régule, de façon inconnue, l'expression de *Cdx1* dans ce tissu (Plateroti et al., 2001).

Ce RARE serait-il requis de manière spécifique pour permettre l'autorégulation de *Cdx1* comme le suggère indirectement la perte d'autorégulation chez les mutants RARE? Le remplacement de cet élément par un élément classique DR5 causerait-il une mauvaise expression de *Cdx1*? Ceci impliquerait une fonction particulière à l'élément RARE qu'un élément DR5 qui ne répond qu'à RA ne peut remplir. La position de cet élément et sa distance au site d'initiation de la transcription sont-elle critiques? L'élément de réponse à RA situé dans le premier intron joue t-il réellement un rôle chez la souris?

Toutes ces questions demeurent ouvertes et chaque réponse amène avec elle son propre bagage d'interrogations. J'espère finalement que les travaux que j'ai réalisés, ainsi que les nombreux outils en cours de développement dans le laboratoire de mon superviseur, ouvriront de multiples avenues pour mieux comprendre comment l'expression de *Cdx1* est contrôlée et quel contrôle ce dernier applique t-il ensuite à son tour sur différents gènes

cibles, dont les *Hox* et comment ceux-ci établissent-ils en conséquence l'identité des segments le long de l'axe AP chez l'embryon en développement.

Bibliographie

Reference List

- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., and Petkovich, M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15, 226-240.
- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Wood, C., MacLean, G., Chambon, P., and Petkovich, M. (2003). Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* 130, 1449-1459.
- Abu-Abed, S.S., Beckett, B.R., Chiba, H., Chithalen, J.V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 273, 2409-2415.
- Abu-Shaar, M., Ryoo, H.D., and Mann, R.S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* 13, 935-945.
- Akam, M. (1989). *Hox* and *HOM*: homologous gene families in insects and vertebrates. *Cell* 57, 347-349.
- Alkema, M.J., van der Lugt, N.M., Bobeldijk, R.C., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of *bmi-1* in transgenic mice. *Nature* 374, 724-727.
- Allan, D., Houle, M., Bouchard, N., Meyer, B.I., Gruss, P., and Lohnes, D. (2001). RAR gamma and *Cdx1* interactions in vertebral patterning. *Developmental Biology* 240, 46-60.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Altaba, A. and Jessell, T. (1991). Retinoic acid modifies mesodermal patterning in early *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 5, 175-187.
- Altaba, A. and Jessell, T.M. (1991b). Retinoic acid modifies the pattern of cell differentiation in the central nervous system of neurula stage *Xenopus* embryos. *Development* 112, 945-958.

- Altmann,C.R. and Brivanlou,A.H. (2001). Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* *203*, 447-482.
- Amaya,E., Musci,T.J., and Kirschner,M.W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* *66*, 257-270.
- Antonchuk,J., Sauvageau,G., and Humphries,R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. *Cell* *109*, 39-45.
- Anzick,S.L., Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., Trent,J.M., and Meltzer,P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* *277*, 965-968.
- Applebury,M.L. and Hargrave,P.A. (1986). Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res.* *26*, 1881-1895.
- Attisano,L. and Wrana,J.L. (1998). Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *10*, 188-194.
- Aubin,J., Chailier,P., Menard,D., and Jeannotte,L. (1999). Loss of *Hoxa5* gene function in mice perturbs intestinal maturation. *Am. J. Physiol* *277*, C965-C973.
- Aubin,J., Dery,U., Lemieux,M., Chailier,P., and Jeannotte,L. (2002). Stomach regional specification requires *Hoxa5*-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development* *129*, 4075-4087.
- Azuma,M., Seki,T., and Fujishita,S. (1990). Changes of egg retinoids during the development of *Xenopus laevis*. *Vision Res.* *30*, 1395-1400.
- Balkan,W., Colbert,M., Bock,C., and Linney,E. (1992). Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 3347-3351.
- Banerjee,U., Renfranz,P.J., Pollock,J.A., and Benzer,S. (1987). Molecular characterization and expression of *sevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. *Cell* *49*, 281-291.
- Bar-Sagi,D. and Hall,A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* *103*, 227-238.
- Barger,P.M., Browning,A.C., Garner,A.N., and Kelly,D.P. (2001). p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha: a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J. Biol. Chem.* *276*, 44495-44501.

- Barna,M., Hawe,N., Niswander,L., and Pandolfi,P.P. (2000). Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* 25, 166-172.
- Bastian,H. and Gruss,P. (1990). A murine even-skipped homologue, *Evx 1*, is expressed during early embryogenesis and neurogenesis in a biphasic manner. [erratum appears in *EMBO J* 1991 Dec;10(12):3978.]. *EMBO Journal* 9, 1839-1852.
- Bavik,C.O., Busch,C., and Eriksson,U. (1992). Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* 267, 23035-23042.
- Beck,F., Chawengsaksophak,K., Waring,P., Playford,R.J., and Furness,J.B. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in *Cdx2* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 7318-7323.
- Beck,F., Erler,T., Russell,A., and James,R. (1995). Expression of *Cdx-2* in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* 204, 219-227.
- Beck,F., Tata,F., and Chawengsaksophak,K. (2000). Homeobox genes and gut development [Review]. *Bioessays* 22, 431-441.
- Bel,S., Core,N., Djabali,M., Kieboom,K., van der,L.N., Alkema,M.J., and van Lohuizen,M. (1998). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes in mice. *Development* 125, 3543-3551.
- Bel-Vialar,S., Core,N., Terranova,R., Goudot,V., Boned,A., and Djabali,M. (2000). Altered retinoic acid sensitivity and temporal expression of *Hox* genes in polycomb-M33-deficient mice. *Dev. Biol.* 224, 238-249.
- Bel-Vialar,S., Itasaki,N., and Krumlauf,R. (2002). Initiating *Hox* gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the *HoxB* genes in two distinct groups. *Development* 129, 5103-5115.
- Berghagen,H., Ragnhildstveit,E., Krogsrud,K., Thuestad,G., Apriletti,J., and Saatcioglu,F. (2002). Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor TRalpha from a negative hormone response element. *J. Biol. Chem.* 277, 49517-49522.
- Berthelsen,J., Kilstrup-Nielsen,C., Blasi,F., Mavilio,F., and Zappavigna,V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* 13, 946-953.
- Berthelsen,J., Zappavigna,V., Ferretti,E., Mavilio,F., and Blasi,F. (1998a). The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* 17, 1434-1445.

- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F., and Blasi, F. (1998b). Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *EMBO J.* *17*, 1423-1433.
- Bienz, M. (1994). Homeotic genes and positional signalling in the drosophila viscera [Review]. *Trends in Genetics* *10*, 22-26.
- Bikle, D.D., Tu, C.L., Xie, Z., and Oda, Y. (2003). Vitamin D regulated keratinocyte differentiation: Role of coactivators. *J. Cell Biochem.* *88*, 290-295.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* *12*, 1638-1651.
- Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T., and Norum, K.R. (1990). Transport and storage of vitamin A. *Science* *250*, 399-404.
- Blondel, A., Renaud, J.P., Fischer, S., Moras, D., and Karplus, M. (1999). Retinoic acid receptor: a simulation analysis of retinoic acid binding and the resulting conformational changes. *J. Mol. Biol.* *291*, 101-115.
- Blumberg, B., Bolado, J., Jr., Moreno, T.A., Kintner, C., Evans, R.M., and Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* *124*, 373-379.
- Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D., and Mavilio, F. (1991). HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.* *7*, 329-334.
- Boudjelal, M., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2002). Retinoid signaling is attenuated by proteasome-mediated degradation of retinoid receptors in human keratinocyte HaCaT cells. *Exp. Cell Res.* *274*, 130-137.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol. Cell* *5*, 289-298.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* *94*, 109-118.
- Boylan, J.F. and Gudas, L.J. (1991). Overexpression of the cellular retinoic acid binding protein-I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell Biol.* *112*, 965-979.

- Brakebusch,C., Grose,R., Quondamatteo,F., Ramirez,A., Jorcano,J.L., Pirro,A., Svensson,M., Herken,R., Sasaki,T., Timpl,R., Werner,S., and Fassler,R. (2000). Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *EMBO J.* 19, 3990-4003.
- Brantjes,H., Roose,J., van De,W.M., and Clevers,H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* 29, 1410-1419.
- Brem,R., Certa,U., Neeb,M., Nair,A.P.K., and Moroni,C. (2001). Global analysis of differential gene expression after transformation with the v-H-ras oncogene in a murine tumor model. *Oncogene* 20, 2854-2858.
- Brooke,N.M., Garcia-Fernandez,J., and Holland,P.W. (1998). The *ParaHox* gene faisceau is an evolutionary sister of the *Hox* gene faisceau. *Nature* 392, 920-922.
- Brzozowski,A.M., Pike,A.C., Dauter,Z., Hubbard,R.E., Bonn,T., Engstrom,O., Ohman,L., Greene,G.L., Gustafsson,J.A., and Carlquist,M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- Burke,A.C., Nelson,C.E., Morgan,B.A., and Tabin,C. (1995). *Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121, 333-346.
- Burris,T.P., Nawaz,Z., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1995). A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9525-9529.
- Bushdid,P.B., Brantley,D.M., Yull,F.E., Blaeuer,G.L., Hoffman,L.H., Niswander,L., and Kerr,L.D. (1998). Inhibition of NF-kappaB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature* 392, 615-618.
- Cadepond,F., Schweizer-Groyer,G., Segard-Maurel,I., Jibard,N., Hollenberg,S.M., Giguere,V., Evans,R.M., and Baulieu,E.E. (1991). Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticosteroid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* 266, 5834-5841.
- Cairns,B.R. (1998). Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *Trends Biochem. Sci.* 23, 20-25.
- Calleja,M., Moreno,E., Pelaz,S., and Morata,G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252-255.

- Cao,X., Teitelbaum,S.L., Zhu,H.J., Zhang,L., Feng,X., and Ross,F.P. (1996). Competition for a unique response element mediates retinoic acid inhibition of vitamin D3-stimulated transcription. *J. Biol. Chem.* *271*, 20650-20654.
- Carpenter,E.M., Goddard,J.M., Chisaka,O., Manley,N.R., and Capecchi,M.R. (1993). Loss of *Hox-A1* (*Hox-1.6*) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* *118*, 1063-1075.
- Cavarretta,I.T., Mukopadhyay,R., Lonard,D.M., Cowser,L.M., Bennett,C.F., O'Malley,B.W., and Smith,C.L. (2002). Reduction of coactivator expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits ERalpha transcriptional activity and MCF-7 proliferation. *Mol. Endocrinol.* *16*, 253-270.
- Cecconi,F., Proetzel,G., Alvarez-Bolado,G., Jay,D., and Gruss,P. (1997). Expression of *Meis2*, a Knotted-related murine homeobox gene, indicates a role in the differentiation of the forebrain and the somitic mesoderm. *Dev Dyn.* *210*, 184-190.
- Chakravarti,D., LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M., and Evans,R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* *383*, 99-103.
- Chambon,P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* *10*, 940-954.
- Chan,S.K. and Mann,R.S. (1996). A structural model for a homeotic protein-extradenticle-DNA complex accounts for the choice of HOX protein in the heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 5223-5228.
- Chan,S.K., Ryoo,H.D., Gould,A., Krumlauf,R., and Mann,R.S. (1997). Switching the in vivo specificity of a minimal *Hox*-responsive element. *Development* *124*, 2007-2014.
- Chang,C.P., Brocchieri,L., Shen,W.F., Largman,C., and Cleary,M.L. (1996). Pbx modulation of *Hox* homeodomain amino-terminal arms establishes different DNA-binding specificities across the *Hox* locus. *Mol. Cell Biol.* *16*, 1734-1745.
- Chang,C.P., Shen,W.F., Rozenfeld,S., Lawrence,H.J., Largman,C., and Cleary,M.L. (1995). Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of *Hox* proteins. *Genes Dev.* *9*, 663-674.
- Charite,J., de Graaff,W., Consten,D., Reijnen,M.J., Korving,J., and Deschamps,J. (1998). Transducing positional information to the *Hox* genes: critical interaction of *cdx* gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* *125*, 4349-4358.

Chawengsaksophak,K. and Beck,F. (1996). Chromosomal localization of *cdx2*, a murine homologue of the *Drosophila* gene *caudal*, to mouse chromosome 5. *Genomics* 34, 270-271.

Chawengsaksophak,K., James,R., Hammond,V.E., Kontgen,F., and Beck,F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* 386, 84-87.

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

Chen,D., Ma,H., Hong,H., Koh,S.S., Huang,S.M., Schurter,B.T., Aswad,D.W., and Stallcup,M.R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.

Chen,F. and Capecchi,M.R. (1999). Paralogous mouse *Hox* genes, *Hoxa9*, *Hoxb9*, and *Hoxd9*, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 541-546.

Chen,F., Greer,J., and Capecchi,M.R. (1998). Analysis of *Hoxa7/Hoxb7* mutants suggests periodicity in the generation of the different sets of vertebrae. *Mech. Dev.* 77, 49-57.

Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy,L., Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

Chen,J.D. and Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Chen,J.D., Umesono,K., and Evans,R.M. (1996). SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7567-7571.

Chen,N., Baudino,T., MacDonald,P.N., Green,M., Kelley,W.L., Burnett,J.W., and Buller,R.M. (2000). Selective inhibition of nuclear steroid receptor function by a protein from a human tumorigenic poxvirus. *Virology* 274, 17-25.

Chen,Y., Huang,L., Russo,A.F., and Solursh,M. (1992). Retinoic acid is enriched in Hensen's node and is developmentally regulated in the early chicken embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10056-10059.

- Chiba,H., Clifford,J., Metzger,D., and Chambon,P. (1997). Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* *17*, 3013-3020.
- Chisaka,O. and Capecchi,M.R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* *350*, 473-479.
- Cho,K.W. and De Robertis,E.M. (1990). Differential activation of *Xenopus* homeo box genes by mesoderm-inducing growth factors and retinoic acid. *Genes Dev.* *4*, 1910-1916.
- Chou,W.C., Prokova,V., Shiraishi,K., Valcourt,U., Moustakas,A., Hadzopoulou-Cladaras,M., Zannis,V.I., and Kardassis,D. (2003). Mechanism of a Transcriptional Cross Talk between Transforming Growth Factor-beta-regulated Smad3 and Smad4 Proteins and Orphan Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor-4. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1279-1294.
- Christ,B. and Ordahl,C.P. (1995). Early stages of chick somite development [Review]. *Anatomy & Embryology* *191*, 381-396.
- Ciruna,B.G., Schwartz,L., Harpal,K., Yamaguchi,T.P., and Rossant,J. (1997). Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (*Fgfr1*) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* *124*, 2829-2841.
- Cohen,R.N., Brzostek,S., Kim,B., Chorev,M., Wondisford,F.E., and Hollenberg,A.N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1049-1061.
- Cohen,R.N., Putney,A., Wondisford,F.E., and Hollenberg,A.N. (2000). The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol. Endocrinol.* *14*, 900-914.
- Cohen,R.N., Wondisford,F.E., and Hollenberg,A.N. (1998). Two separate NCoR (nuclear receptor corepressor) interaction domains mediate corepressor action on thyroid hormone response elements. *Mol. Endocrinol.* *12*, 1567-1581.
- Cohlan,S.Q. (1953). Excessive intakes of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* *117*, 535-536.
- Condie,B.G. and Capecchi,M.R. (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* *119*, 579-595.
- Conlon,R.A. (1995). Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genet.* *11*, 314-319.

- Conlon,R.A. and Rossant,J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine *Hox-2* genes in vivo. *Development* 116, 357-368.
- Core,N., Bel,S., Gaunt,S.J., Aurrand-Lions,M., Pearce,J., Fisher,A., and Djabali,M. (1997). Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33-deficient mice. *Development* 124, 721-729.
- Costaridis,P., Horton,C., Zeitlinger,J., Holder,N., and Maden,M. (1996). Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev. Dyn.* 205, 41-51.
- Cote,J., Quinn,J., Workman,J.L., and Peterson,C.L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.
- Coulthard,V.H., Matsuda,S., and Heery,D.M. (2003). An extended LXXLL motif sequence determines the nuclear receptor binding specificity of TRAP220. *J. Biol. Chem.* 278, 10942-10951.
- Creech,K.J., Schuh,T., Juchau,M.R., and Kimelman,D. (1994). Temporal distribution, localization and metabolism of all-trans-retinol, didehydroretinol and all-trans-retinal during *Xenopus* development. *Biochem. J.* 301 (Pt 1), 111-119.
- Czermin,B., Melfi,R., McCabe,D., Seitz,V., Imhof,A., and Pirrotta,V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111, 185-196.
- D'Esposito,M., Morelli,F., Acampora,D., Migliaccio,E., Simeone,A., and Boncinelli,E. (1991). EVX2, a human homeobox gene homologous to the even-skipped segmentation gene, is localized at the 5' end of HOX4 locus on chromosome 2. *Genomics* 10, 43-50.
- Damm,K., Thompson,C.C., and Evans,R.M. (1989). Protein encoded by v-erbA functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* 339, 593-597.
- Davidson,A.J., Ernst,P., Wang,Y., Dekens,M.P., Kingsley,P.D., Palis,J., Korsmeyer,S.J., Daley,G.Q., and Zon,L.I. (2003). *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. *Nature* 425, 300-306.
- de Urquiza,A.M., Liu,S., Sjoberg,M., Zetterstrom,R.H., Griffiths,W., Sjoval,J., and Perlmann,T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
- Dearolf,C.R., Topol,J., and Parker,C.S. (1989). The caudal gene product is a direct activator of fushi tarazu transcription during *Drosophila* embryogenesis. *Nature* 341, 340-343.

Deltour,L., Foglio,M.H., and Duester,G. (1999a). Impaired retinol utilization in Adh4 alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* 25, 1-10.

Deltour,L., Foglio,M.H., and Duester,G. (1999b). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 16796-16801.

Deschamps,J., van Den,A.E., Forlani,S., de Graaff,W., Oosterveen,T., Roelen,B., and Roelfsema,J. (1999). Initiation, establishment and maintenance of *Hox* gene expression patterns in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 635-650.

Deschamps,J. and Wijgerde,M. (1993). Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev. Biol.* 156, 473-480.

Di Croce,L., Koop,R., Venditti,P., Westphal,H.M., Nightingale,K.P., Corona,D.F., Becker,P.B., and Beato,M. (1999). Two-step synergism between the progesterone receptor and the DNA-binding domain of nuclear factor 1 on MMTV minichromosomes. *Mol. Cell* 4, 45-54.

Di Rocco,G., Gavalas,A., Popperl,H., Krumlauf,R., Mavilio,F., and Zappavigna,V. (2001). The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the *Hoxb1* auto-regulatory enhancer function. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20506-20515.

Dilworth,F.J. and Chambon,P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.

Dolle,P., Ruberte,E., Kastner,P., Petkovich,M., Stoner,C.M., Gudas,L.J., and Chambon,P. (1989). Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* 342, 702-705.

Dong,D. and Noy,N. (1998). Heterodimer formation by retinoid X receptor: regulation by ligands and by the receptor's self-association properties. *Biochemistry* 37, 10691-10700.

Downes,M., Ordentlich,P., Kao,H.Y., Alvarez,J.G., and Evans,R.M. (2000). Identification of a nuclear domain with deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10330-10335.

Drummond,F., Sowden,J., Morrison,K., and Edwards,Y.H. (1996). The caudal-type homeobox protein Cdx-2 binds to the colon promoter of the carbonic anhydrase 1 gene. *European Journal of Biochemistry* 236, 670-681.

- Duboule, D. (1994). Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev. Suppl* 135-142.
- Duboule, D. (1998). Vertebrate hox gene regulation: faiseauing and/or colinearity? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 514-518.
- Duboule, D. and Dolle, P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497-1505.
- Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquie, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal *Hox* gene activation. *Cell* 106, 219-232.
- Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.
- Duluc, I., Lorentz, O., Fritsch, C., Leberquier, C., Kedinger, M., and Freund, J.N. (1997). Changing intestinal connective tissue interactions alters homeobox gene expression in epithelial cells. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 11), 1317-1324.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and Rijli, F.M. (1997). In vivo functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124, 399-410.
- Dupe, V., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126, 5051-5059.
- Dupe, V. and Lumsden, A. (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development* 128, 2199-2208.
- Duprey, P., Chowdhury, K., Dressler, G.R., Balling, R., Simon, D., Guenet, J.L., and Gruss, P. (1988). A mouse gene homologous to the Drosophila gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes & Development* 2, 1647-1654.
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M., and Chambon, P. (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71, 73-85.
- Durston, A.J., Timmermans, J.P., Hage, W.J., Hendriks, H.F., de Vries, N.J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P.D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140-144.

- Eastman,Q. and Grosschedl,R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 233-240.
- Ehrman,L.A. and Yutzey,K.E. (2001). Anterior expression of the caudal homologue cCdx-B activates a posterior genetic program in avian embryos. *Dev. Dyn.* *221*, 412-421.
- Epstein,M., Pillemer,G., Yelin,R., Yisraeli,J.K., and Fainsod,A. (1997). Patterning of the embryo along the anterior-posterior axis: the role of the caudal genes. *Development* *124*, 3805-3814.
- Espada,J., Perez-Moreno,M., Braga,V.M., Rodriguez-Viciana,P., and Cano,A. (1999). H-Ras activation promotes cytoplasmic accumulation and phosphoinositide 3-OH kinase association of beta-catenin in epidermal keratinocytes. *J. Cell Biol.* *146*, 967-980.
- Favier,B., Rijli,F.M., Fromental-Ramain,C., Fraulob,V., Chambon,P., and Dolle,P. (1996). Functional cooperation between the non-paralogous genes *Hoxa-10* and *Hoxd-11* in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* *122*, 449-460.
- Fawcett,D., Pasceri,P., Fraser,R., Colbert,M., Rossant,J., and Giguere,V. (1995). Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development* *121*, 671-679.
- Featherstone,M.S., Baron,A., Gaunt,S.J., Mattei,M.G., and Duboule,D. (1988). *Hox-5.1* defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 4760-4764.
- Ferretti,E., Marshall,H., Popperl,H., Maconochie,M., Krumlauf,R., and Blasi,F. (2000). Segmental expression of *Hoxb2* in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and *Hox* proteins. *Development* *127*, 155-166.
- Ferrier,D.E.K. and Holland,P.W.H. (2001). Ancient origin of the *Hox* gene faisceau [Review]. *Nature Reviews Genetics* *2*, 33-38.
- Fiorella,P.D., Giguere,V., and Napoli,J.L. (1993). Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J. Biol. Chem.* *268*, 21545-21552.
- Fiorella,P.D. and Napoli,J.L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* *266*, 16572-16579.
- Fogh,K., Voorhees,J.J., and Astrom,A. (1993). Expression, purification, and binding properties of human cellular retinoic acid-binding protein type I and type II. *Arch. Biochem. Biophys.* *300*, 751-755.

- Folberg, A., Kovacs, E.N., and Featherstone, M.S. (1997). Characterization and retinoic acid responsiveness of the murine *Hoxd4* transcription unit. *J. Biol. Chem.* *272*, 29151-29157.
- Folberg, A., Kovacs, E.N., Huang, H., Houle, M., Lohnes, D., and Featherstone, M.S. (1999a). *Hoxd4* and *Rarg* interact synergistically in the specification of the cervical vertebrae. *Mech. Dev* *89*, 65-74.
- Folberg, A., Nagy, K.E., Luo, J., Giguere, V., and Featherstone, M.S. (1999b). RARbeta mediates the response of *Hoxd4* and *Hoxb4* to exogenous retinoic acid. *Dev Dyn.* *215*, 96-107.
- Frasch, M., Chen, X., and Lufkin, T. (1995). Evolutionary-conserved enhancers direct region-specific expression of the murine *Hoxa-1* and *Hoxa-2* loci in both mice and *Drosophila*. *Development* *121*, 957-974.
- Freedman, L.P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* *97*, 5-8.
- Freund, J.N., Boukamel, R., and Benazzouz, A. (1992). Gradient expression of *Cdx* along the rat intestine throughout postnatal development. *FEBS Letters* *314*, 163-166.
- Frohman, M.A., Boyle, M., and Martin, G.R. (1990). Isolation of the mouse *Hox-2.9* gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development* *110*, 589-607.
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M.J., Clevers, H., and Grosschedl, R. (1999). *Wnt3a*^{-/-}-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*^(-/-)*Tcf1*^(-/-) mice. *Genes Dev* *13*, 709-717.
- Gale, E., Zile, M., and Maden, M. (1999). Hindbrain respecification in the retinoid-deficient quail. *Mech. Dev* *89*, 43-54.
- Gamer, L.W. and Wright, C.V. (1993). Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* *43*, 71-81.
- Gaunt, S.J. (1988). Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of *Hox-3.1* and *Hox-1.5*. *Development* *103*, 135-144.
- Gaunt, S.J. (1994). Conservation in the *Hox* code during morphological evolution. *Int. J. Dev. Biol.* *38*, 549-552.

- Gaunt,S.J. (2000). Evolutionary shifts of vertebrate structures and *Hox* expression up and down the axial series of segments: a consideration of possible mechanisms. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 109-117.
- Gaunt,S.J. (2001). Gradients and forward spreading of vertebrate *Hox* gene expression detected by using a *Hox/lacZ* transgene. *Dev Dyn.* 221, 26-36.
- Gaunt,S.J., Dean,W., Sang,H., and Burton,R.D. (1999). Evidence that *Hoxa* expression domains are evolutionarily transposed in spinal ganglia, and are established by forward spreading in paraxial mesoderm. *Mech. Dev.* 82, 109-118.
- Gaunt,S.J., Drage,D., and Cockley,A. (2003). Vertebrate caudal gene expression gradients investigated by use of chick *cdx-A/lacZ* and mouse *cdx-1/lacZ* reporters in transgenic mouse embryos: evidence for an intron enhancer. *Mech. Dev.* 120, 573-586.
- Gaunt,S.J., Krumlauf,R., and Duboule,D. (1989). Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, -2.6 and -5.1, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* 107, 131-141.
- Gaunt,S.J., Miller,J.R., Powell,D.J., and Duboule,D. (1986). Homoeobox gene expression in mouse embryos varies with position by the primitive streak stage. *Nature* 324, 662-664.
- Gaunt,S.J. and Strachan,L. (1996). Temporal colinearity in expression of anterior *Hox* genes in developing chick embryos. *Dev. Dyn.* 207, 270-280.
- Gavalas,A. and Krumlauf,R. (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 380-386.
- Gavalas,A., Studer,M., Lumsden,A., Rijli,F.M., Krumlauf,R., and Chambon,P. (1998). *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 125, 1123-1136.
- Gehring,W.J. (1993). Exploring the homeobox. *Gene* 135, 215-221.
- Gehring,W.J., Muller,M., Affolter,M., Percival-Smith,A., Billeter,M., Qian,Y.Q., Otting,G., and Wuthrich,K. (1990). The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends Genet.* 6, 323-329.
- Gehring,W.J., Qian,Y.Q., Billeter,M., Furukubo-Tokunaga,K., Schier,A.F., Resendez-Perez,D., Affolter,M., Otting,G., and Wuthrich,K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.

- Gellon,G. and McGinnis,W. (1998). Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of hox expression patterns [Review]. *Bioessays* 20, 116-125.
- German,M.S., Wang,J., Chadwick,R.B., and Rutter,W.J. (1992). Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes & Development* 6, 2165-2176.
- German,M.S., Wang,J., Fernald,A.A., Espinosa,R., III, Le Beau,M.M., and Bell,G.I. (1994). Localization of the genes encoding two transcription factors, LMX1 and CDX3, regulating insulin gene expression to human chromosomes 1 and 13. *Genomics* 24, 403-404.
- Gianni,M., Bauer,A., Garattini,E., Chambon,P., and Rochette-Egly,C. (2002). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J.* 21, 3760-3769.
- Gianni,M., Tarrade,A., Nigro,E.A., Garattini,E., and Rochette-Egly,C. (2003). The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. *J. Biol. Chem.*
- Giese,K. and Grosschedl,R. (1993). LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. *EMBO J.* 12, 4667-4676.
- Giguere,V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15, 61-79.
- Giguere,V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689-725.
- Giguere,V., Ong,E.S., Segui,P., and Evans,R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
- Glass,C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15, 391-407.
- Glass,C.K. (1996). Some new twists in the regulation of gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J. Endocrinol.* 150, 349-357.
- Glass,C.K., Holloway,J.M., Devary,O.V., and Rosenfeld,M.G. (1988). The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell* 54, 313-323.

Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.

Goodman,D.S. (1984). Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 73, 1375-1379.

Goodman,R.H. and Smolik,S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-1577.

Gould,A., Itasaki,N., and Krumlauf,R. (1998). Initiation of rhombomeric *Hoxb4* expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21, 39-51.

Gould,A., Morrison,A., Sproat,G., White,R.A., and Krumlauf,R. (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping *Hox* expression patterns. *Genes Dev* 11, 900-913.

Graham,A., Papalopulu,N., and Krumlauf,R. (1989). The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57, 367-378.

Grandel,H., Lun,K., Rauch,G.J., Rhinn,M., Piotrowski,T., Houart,C., Sordino,P., Kuchler,A.M., Schulte-Merker,S., Geisler,R., Holder,N., Wilson,S.W., and Brand,M. (2002). Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* 129, 2851-2865.

Grant,P.A., Schieltz,D., Pray-Grant,M.G., Steger,D.J., Reese,J.C., Yates,J.R., III, and Workman,J.L. (1998). A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94, 45-53.

Grapin-Botton,A., Bonnin,M.A., and Le Douarin,N.M. (1997). *Hox* gene induction in the neural tube depends on three parameters: competence, signal supply and paralogue group. *Development* 124, 849-859.

Greco,T.L., Takada,S., Newhouse,M.M., McMahon,J.A., McMahon,A.P., and Camper,S.A. (1996). Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev.* 10, 313-324.

Green,S., Tugwood,J.D., and Issemann,I. (1992). The molecular mechanism of peroxisome proliferator action: a model for species differences and mechanistic risk assessment. *Toxicol. Lett.* 64-65 *Spec No*, 131-139.

Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C.X., Fondell, J.D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R.G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol. Cell* 3, 97-108.

Guthrie, S. and Lumsden, A. (1991). Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development* 112, 221-229.

Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M.C., Kane, D.A., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kelsh, R.N., Odenthal, J., Warga, R.M., and Nusslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 143-151.

Hanson, R.D., Hess, J.L., Yu, B.D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N.M., Shashikant, C.S., Ruddle, F.H., Seto, M., and Korsmeyer, S.J. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14372-14377.

Haselbeck, R.J., Hoffmann, I., and Duester, G. (1999). Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* 25, 353-364.

Heery, D.M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M.G., and Sheppard, H. (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 6695-6702.

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

Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.

Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., and Wilson, S.W. (2000). Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.

Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68, 397-406.

- Hodam, J.R. and Creek, K.E. (1998). Comparison of the metabolism of retinol delivered to human keratinocytes either bound to serum retinol-binding protein or added directly to the culture medium. *Exp. Cell Res.* *238*, 257-264.
- Hogan, B.L., Thaller, C., and Eichele, G. (1992). Evidence that Hensen's node is a site of retinoic acid synthesis. *Nature* *359*, 237-241.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J., and Stallcup, M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2735-2744.
- Horan, G.S., Ramirez-Solis, R., Featherstone, M.S., Wolgemuth, D.J., Bradley, A., and Behringer, R.R. (1995). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* *9*, 1667-1677.
- Horan, G.S., Wu, K., Wolgemuth, D.J., and Behringer, R.R. (1994). Homeotic transformation of cervical vertebrae in *Hoxa-4* mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 12644-12648.
- Horb, M.E. (2000). Patterning the endoderm: the importance of neighbours. *Bioessays* *22*, 599-602.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., and . (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* *377*, 397-404.
- Horn, J.M. and Ashworth, A. (1995). A member of the caudal family of homeobox genes maps to the X-inactivation centre region of the mouse and human X chromosomes. *Human Molecular Genetics* *4*, 1041-1047.
- Horton, C. and Maden, M. (1995). Endogenous distribution of retinoids during normal development and teratogenesis in the mouse embryo. *Dev. Dyn.* *202*, 312-323.
- Houle, M., Prinos, P., Iulianella, A., Bouchard, N., and Lohnes, D. (2000). Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol. Cell Biol.* *20*, 6579-6586.
- Houle, M., Sylvestre, J.R., and Lohnes, D. (2003). Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo. *Development* *130*, 6555-6567.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* *402*, 93-96.

- Huang,D., Chen,S.W., and Gudas,L.J. (2002). Analysis of two distinct retinoic acid response elements in the homeobox gene *Hoxb1* in transgenic mice. *Dev. Dyn.* 223, 353-370.
- Huang,D., Chen,S.W., Langston,A.W., and Gudas,L.J. (1998a). A conserved retinoic acid responsive element in the murine *Hoxb-1* gene is required for expression in the developing gut. *Development - Supplement 125*, 3235-3246.
- Huang,N., vom,B.E., Garnier,J.M., Lerouge,T., Vonesch,J.L., Lutz,Y., Chambon,P., and Losson,R. (1998b). Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. *EMBO J.* 17, 3398-3412.
- Hunter,C.P., Harris,J.M., Maloof,J.N., and Kenyon,C. (1999). *Hox* gene expression in a single *Caenorhabditis elegans* cell is regulated by a caudal homolog and intercellular signals that inhibit wnt signaling. *Development* 126, 805-814.
- Ikeya,M. and Takada,S. (2001). Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech. Dev* 103, 27-33.
- Isaacs,H.V., Andreazzoli,M., and Slack,J.M. (1999). Anteroposterior patterning by mutual repression of orthodenticle and caudal-type transcription factors. *Evolution & Development* 1, 143-152.
- Isaacs,H.V., Pownall,M.E., and Slack,J.M. (1998). Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO J.* 17, 3413-3427.
- Iulianella,A., Beckett,B., Petkovich,M., and Lohnes,D. (1999). A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev Biol.* 205, 33-48.
- Iulianella,A. and Lohnes,D. (1997). Contribution of retinoic acid receptor gamma to retinoid-induced craniofacial and axial defects. *Dev. Dyn.* 209, 92-104.
- Iulianella,A. and Lohnes,D. (2002). Chimeric analysis of retinoic acid receptor function during cardiac looping. *Developmental Biology* 247, 62-75.
- Jackson,T.A., Richer,J.K., Bain,D.L., Takimoto,G.S., Tung,L., and Horwitz,K.B. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol. Endocrinol.* 11, 693-705.

- James,R., Erler,T., and Kazenwadel,J. (1994). Structure of the murine homeobox gene *cdx-2*. Expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *Journal of Biological Chemistry* 269, 15229-15237.
- James,R. and Kazenwadel,J. (1991). Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *Journal of Biological Chemistry* 266, 3246-3251.
- Jepsen,K., Hermanson,O., Onami,T.M., Gleiberman,A.S., Lunyak,V., McEvilly,R.J., Kurokawa,R., Kumar,V., Liu,F., Seto,E., Hedrick,S.M., Mandel,G., Glass,C.K., Rose,D.W., and Rosenfeld,M.G. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* 102, 753-763.
- Jin,T. and Drucker,D.J. (1996). Activation of proglucagon gene transcription through a novel promoter element by the caudal-related homeodomain protein *cdx-2/3*. *Mol. Cell Biol.* 16, 19-28.
- Jin,T., Trinh,D.K., Wang,F., and Drucker,D.J. (1997). The caudal homeobox protein *cdx-2/3* activates endogenous proglucagon gene expression in InR1-G9 islet cells. *Molecular Endocrinology* 11, 203-209.
- Johnson,F.B., Parker,E., and Krasnow,M.A. (1995). Extradenticle protein is a selective cofactor for the *Drosophila* homeotics: role of the homeodomain and YPWM amino acid motif in the interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 739-743.
- Juan,A.H. and Ruddle,F.H. (2003). Enhancer timing of *Hox* gene expression: deletion of the endogenous *Hoxc8* early enhancer. *Development* 130, 4823-4834.
- Kadam,S. and Emerson,B.M. (2003). Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol. Cell* 11, 377-389.
- Kadowaki,Y., Toyoshima,K., and Yamamoto,T. (1995). Dual transcriptional control by Ear3/COUP: negative regulation through the DR1 direct repeat and positive regulation through a sequence downstream of the transcriptional start site of the mouse mammary tumor virus promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4432-4436.
- Kalionis,B. and O'Farrell,P.H. (1993). A universal target sequence is bound in vitro by diverse homeodomains. *Mech. Dev.* 43, 57-70.
- Kalkhoven,E., Valentine,J.E., Heery,D.M., and Parker,M.G. (1998). Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J.* 17, 232-243.

- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.
- Kanzler, B., Kuschert, S.J., Liu, Y.H., and Mallo, M. (1998). *Hoxa-2* restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125, 2587-2597.
- Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.M., Zelent, A., Leroy, P., Staub, A., and Chambon, P. (1990). Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 2700-2704.
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83, 859-869.
- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J.M., and Chambon, P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313-326.
- Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K.I., Endoh, H., and Yanagisawa, J. (2000). Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes Cells* 5, 593-601.
- Kersten, S., Gronemeyer, H., and Noy, N. (1997a). The DNA binding pattern of the retinoid X receptor is regulated by ligand-dependent modulation of its oligomeric state. *J. Biol. Chem.* 272, 12771-12777.
- Kersten, S., Reczek, P.R., and Noy, N. (1997b). The tetramerization region of the retinoid X receptor is important for transcriptional activation by the receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 29759-29768.
- Kessel, M. (1992). Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* 115, 487-501.
- Kessel, M. and Gruss, P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *Hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* 67, 89-104.
- Kieny, M., Mauger, A., and Sengel, P. (1972). Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev. Biol.* 28, 142-161.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., Dyck, J.A., and Evans, R.M. (1992a). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 1448-1452.

- Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1992b). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355, 446-449.
- Klochender-Yeivin, A., Fiette, L., Barra, J., Muchardt, C., Babinet, C., and Yaniv, M. (2000). The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep.* 1, 500-506.
- Knoepfler, P.S., Lu, Q., and Kamps, M.P. (1996). Pbx-1 *Hox* heterodimers bind DNA on inseparable half-sites that permit intrinsic DNA binding specificity of the *Hox* partner at nucleotides 3' to a TAAT motif. *Nucleic Acids Res.* 24, 2288-2294.
- Koide, T., Downes, M., Chandraratna, R.A., Blumberg, B., and Umesono, K. (2001). Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes Dev* 15, 2111-2121.
- Kolm, P.J., Apekin, V., and Sive, H. (1997). *Xenopus* hindbrain patterning requires retinoid signaling. *Dev Biol.* 192, 1-16.
- Kondo, T. and Duboule, D. (1999). Breaking colinearity in the mouse *HoxD* complex. *Cell* 97, 407-417.
- Kraft, J.C., Schuh, T., Juchau, M., and Kimelman, D. (1994). The retinoid X receptor ligand, 9-cis-retinoic acid, is a potential regulator of early *Xenopus* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3067-3071.
- Krumlauf, R. (1994). *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A., and Glass, C.K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* 371, 528-531.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* 377, 451-454.
- Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol. Cell* 2, 33-42.

- Lamb, T.M. and Harland, R.M. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development* *121*, 3627-3636.
- Lammer, E.J., Chen, D.T., Hoar, R.M., Agnish, N.D., Benke, P.J., Braun, J.T., Curry, C.J., Fernhoff, P.M., Grix, A.W., Jr., Lott, I.T., and . (1985). Retinoic acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.* *313*, 837-841.
- Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., and Chambon, P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* *121*, 539-548.
- Langst, G. and Becker, P.B. (2001). Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J. Cell Sci.* *114*, 2561-2568.
- Langston, A.W., Thompson, J.R., and Gudas, L.J. (1997). Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the *Hox A* and *Hox B* homeobox gene faisceaux. Functional analysis. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 2167-2175.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* *97*, 17-27.
- Lanz, R.B., Razani, B., Goldberg, A.D., and O'Malley, B.W. (2002). Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 16081-16086.
- LaRonde-LeBlanc, N.A. and Wolberger, C. (2003). Structure of *HoxA9* and Pbx1 bound to DNA: *Hox* hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev.* *17*, 2060-2072.
- Lee, J.W., Ryan, F., Swaffield, J.C., Johnston, S.A., and Moore, D.D. (1995a). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* *374*, 91-94.
- Lee, M.O., Liu, Y., and Zhang, X.K. (1995b). A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormonal sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol. Cell Biol.* *15*, 4194-4207.
- Lee, M.S., Klierer, S.A., Provencal, J., Wright, P.E., and Evans, R.M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* *260*, 1117-1121.

Lefebvre,B., Mouchon,A., Formstecher,P., and Lefebvre,P. (1998). H11-H12 loop retinoic acid receptor mutants exhibit distinct trans-activating and trans-repressing activities in the presence of natural or synthetic retinoids. *Biochemistry* 37, 9240-9249.

Lehmann,J.M., Jong,L., Fanjul,A., Cameron,J.F., Lu,X.P., Haefner,P., Dawson,M.I., and Pfahl,M. (1992). Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways. *Science* 258, 1944-1946.

Leid,M., Kastner,P., Lyons,R., Nakshatri,H., Saunders,M., Zacharewski,T., Chen,J.Y., Staub,A., Garnier,J.M., Mader,S., and . (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.

Leroy,P., Krust,A., Zelent,A., Mendelsohn,C., Garnier,J.M., Kastner,P., Dierich,A., and Chambon,P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J.* 10, 59-69.

Lessard,J. and Sauvageau,G. (2003). Polycomb group genes as epigenetic regulators of normal and leukemic hemopoiesis. *Exp. Hematol.* 31, 567-585.

Levine,M., Harding,K., Wedeen,C., Doyle,H., Hoey,T., and Radomska,H. (1985). Expression of the homeo box gene family in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 50, 209-222.

Lewis,E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Li,H., Gomes,P.J., and Chen,J.D. (1997a). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8479-8484.

Li,H., Leo,C., Schroen,D.J., and Chen,J.D. (1997b). Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. *Mol. Endocrinol.* 11, 2025-2037.

Lickert,H., Domon,C., Huls,G., Wehrle,C., Duluc,I., Clevers,H., Meyer,B.I., Freund,J.N., and Kemler,R. (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* 127, 3805-3813.

Lickert,H. and Kemler,R. (2002). Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early *Cdx1* gene expression in the mouse. *Dev. Dyn.* 225, 216-220.

- Lin, B.C., Wong, C.W., Chen, H.W., and Privalsky, M.L. (1997). Plasticity of tetramer formation by retinoid X receptors. An alternative paradigm for DNA recognition. *J. Biol. Chem.* *272*, 9860-9867.
- Liu, T., DeCostanzo, A.J., Liu, X.X., Wang, H.Y., Hallagan, S., Moon, R.T., and Malbon, C.C. (2001). G protein signaling from activated rat Frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway. *Science* *292*, 1718-1722.
- Lohnes, D. (2003). The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* *25*, 971-980.
- Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* *73*, 643-658.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Decimo, D., LeMeur, M., Dierich, A., Gorry, P., and Chambon, P. (1995). Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *53*, 475-486.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., and Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* *120*, 2723-2748.
- Lorentz, O., Suh, E.R., Taylor, J.K., Boudreau, F., and Traber, P.G. (1999). CREB-binding [corrected] protein interacts with the homeodomain protein Cdx2 and enhances transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *274*, 7196-7199.
- Losson, R. (1997). KRAB zinc finger proteins and nuclear receptors: a possible cross-talk. *Biol. Chem.* *378*, 579-581.
- Lu, H.C., Eichele, G., and Thaller, C. (1997). Ligand-bound RXR can mediate retinoid signal transduction during embryogenesis. *Development* *124*, 195-203.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 7225-7229.
- Lumsden, A., Sprawson, N., and Graham, A. (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* *113*, 1281-1291.
- Macdonald, P.M. and Struhl, G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* *324*, 537-545.

- MacLean,G., Abu-Abed,S., Dolle,P., Tahayato,A., Chambon,P., and Petkovich,M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech. Dev* 107, 195-201.
- Maconochie,M.K., Nonchev,S., Manzanares,M., Marshall,H., and Krumlauf,R. (2001). Differences in Krox20-dependent regulation of *Hoxa2* and *Hoxb2* during hindbrain development. *Dev. Biol.* 233, 468-481.
- Maden,M. (1999). Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays* 21, 809-812.
- Maden,M., Gale,E., Kostetskii,I., and Zile,M. (1996). Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.* 6, 417-426.
- Maden,M., Graham,A., Zile,M., and Gale,E. (2000). Abnormalities of somite development in the absence of retinoic acid. *Int. J. Dev Biol.* 44, 151-159.
- Maden,M., Sonneveld,E., van der Saag,P.T., and Gale,E. (1998). The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development* 125, 4133-4144.
- Maldonado,E., Hampsey,M., and Reinberg,D. (1999). Repression: targeting the heart of the matter. *Cell* 99, 455-458.
- Malpel,S., Mendelsohn,C., and Cardoso,W.V. (2000). Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127, 3057-3067.
- Malumbres,M., Perez,D.C., I, Hernandez,M.I., Jimenez,M., Corral,T., and Pellicer,A. (2000). Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol. Cell Biol.* 20, 2915-2925.
- Mangelsdorf,D.J., Borgmeyer,U., Heyman,R.A., Zhou,J.Y., Ong,E.S., Oro,A.E., Kakizuka,A., and Evans,R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6, 329-344.
- Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf,D.J., Ong,E.S., Dyck,J.A., and Evans,R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.
- Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P., and . (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.

- Manley,N.R. and Capecchi,M.R. (1995). The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* 121, 1989-2003.
- Manley,N.R. and Capecchi,M.R. (1997). *Hox* group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev. Biol.* 192, 274-288.
- Manley,N.R. and Capecchi,M.R. (1998). *Hox* group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol.* 195, 1-15.
- Mann,R.S. (1995). The specificity of homeotic gene function [Review]. *Bioessays* 17, 855-863.
- Mann,R.S. and Affolter,M. (1998). *Hox* proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 423-429.
- Mann,R.S. and Morata,G. (2000). The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila* [Review]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 16, 243-271.
- Manzanares,M., Cordes,S., Ariza-McNaughton,L., Sadl,V., Maruthainar,K., Barsh,G., and Krumlauf,R. (1999). Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development* 126, 759-769.
- Manzanares,M., Cordes,S., Kwan,C.T., Sham,M.H., Barsh,G.S., and Krumlauf,R. (1997). Segmental regulation of *Hoxb-3* by *kreisler*. *Nature* 387, 191-195.
- Margalit,Y., Yarus,S., Shapira,E., Gruenbaum,Y., and Fainsod,A. (1993). Isolation and characterization of target sequences of the chicken *CdxA* homeobox gene. *Nucleic Acids Research* 21, 4915-4922.
- Marom,K., Shapira,E., and Fainsod,A. (1997). The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech. Dev* 64, 41-52.
- Marshall,H., Morrison,A., Studer,M., Popperl,H., and Krumlauf,R. (1996). Retinoids and *Hox* genes. *FASEB J.* 10, 969-978.
- Marshall,H., Nonchev,S., Sham,M.H., Muchamore,I., Lumsden,A., and Krumlauf,R. (1992). Retinoic acid alters hindbrain *Hox* code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* 360, 737-741.
- Marshall,H., Studer,M., Popperl,H., Aparicio,S., Kuroiwa,A., Brenner,S., and Krumlauf,R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*. *Nature* 370, 567-571.

- McCaffery,P., Wagner,E., O'Neil,J., Petkovich,M., and Drager,U.C. (1999). Dorsal and ventral retinal territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech. Dev.* 82, 119-130.
- McGinnis,W. (1994). A century of homeosis, a decade of homeoboxes. [Review] [69 refs]. *Genetics* 137, 607-611.
- McGinnis,W. and Krumlauf,R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McGrath,K.E. and Palis,J. (1997). Expression of homeobox genes, including an insulin promoting factor, in the murine yolk sac at the time of hematopoietic initiation. *Molecular Reproduction & Development* 48, 145-153.
- McKenna,N.J. and O'Malley,B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474.
- McPherron,A.C., Lawler,A.M., and Lee,S.J. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nat. Genet.* 22, 260-264.
- Mendelsohn,C., Lohnes,D., Decimo,D., Lufkin,T., LeMeur,M., Chambon,P., and Mark,M. (1994a). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120, 2749-2771.
- Mendelsohn,C., Mark,M., Dolle,P., Dierich,A., Gaub,M.P., Krust,A., Lampron,C., and Chambon,P. (1994b). Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev. Biol.* 166, 246-258.
- Mendelsohn,C., Ruberte,E., LeMeur,M., Morriss-Kay,G., and Chambon,P. (1991). Developmental analysis of the retinoic acid-inducible RAR-beta 2 promoter in transgenic animals. *Development* 113, 723-734.
- Merrill,V.K., Diederich,R.J., Turner,F.R., and Kaufman,T.C. (1989). A genetic and developmental analysis of mutations in labial, a gene necessary for proper head formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 135, 376-391.
- Meyer,B.I. and Gruss,P. (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117, 191-203.
- Mic,F.A., Haselbeck,R.J., Cuenca,A.E., and Duyster,G. (2002). Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development* 129, 2271-2282.

- Minucci,S., Horn,V., Bhattacharyya,N., Russanova,V., Ogryzko,V.V., Gabriele,L., Howard,B.H., and Ozato,K. (1997). A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 11295-11300.
- Mitchelmore,C., Troelsen,J.T., Spodsberg,N., Sjostrom,H., and Noren,O. (2000). Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem. J.* *346 Pt 2*, 529-535.
- Miyamoto,T., Kakizawa,T., Ichikawa,K., Nishio,S., Takeda,T., Suzuki,S., Kaneko,A., Kumagai,M., Mori,J., Yamashita,K., Sakuma,T., and Hashizume,K. (2001). The role of hinge domain in heterodimerization and specific DNA recognition by nuclear receptors. *Mol. Cell Endocrinol.* *181*, 229-238.
- Mlodzik,M. and Gehring,W.J. (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* *48*, 465-478.
- Mlodzik,M., Gibson,G., and Gehring,W.J. (1990). Effects of ectopic expression of caudal during *Drosophila* development. *Development - Supplement* *109*, 271-277.
- Monaco,H.L., Rizzi,M., and Coda,A. (1995). Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* *268*, 1039-1041.
- Morales,A.V., de la Rosa,E.J., and de Pablo,F. (1996). Expression of the cCdx-B homeobox gene in chick embryo suggests its participation in rostrocaudal axial patterning. *Developmental Dynamics* *206*, 343-353.
- Moreno,E. and Morata,G. (1999). Caudal is the *Hox* gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* *400*, 873-877.
- Morgan,B.A. and Tabin,C. (1994). *Hox* genes and growth: early and late roles in limb bud morphogenesis. *Dev. Suppl* 181-186.
- Morrison,A., Moroni,M.C., Ariza-McNaughton,L., Krumlauf,R., and Mavilio,F. (1996). In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development - Supplement* *122*, 1895-1907.
- Moskow,J.J., Bullrich,F., Huebner,K., Daar,I.O., and Buchberg,A.M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5434-5443.
- Muller,C. and Leutz,A. (2001). Chromatin remodeling in development and differentiation [Review]. *Current Opinion in Genetics & Development* *11*, 167-174.

- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002). Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell* *111*, 197-208.
- Murphy, L.C., Simon, S.L., Parkes, A., Leygue, E., Dotzlaw, H., Snell, L., Troup, S., Adeyinka, A., and Watson, P.H. (2000). Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* *60*, 6266-6271.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* *89*, 373-380.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C.M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* *10*, 1119-1128.
- Neuteboom, S.T., Peltenburg, L.T., van Dijk, M.A., and Murre, C. (1995). The hexapeptide LFPWMR in *Hoxb-8* is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 9166-9170.
- Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbauer, B., Petkovich, M., Chambon, P., and Dolle, P. (2002a). Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nature Genetics* *31*, 84-88.
- Niederreither, K., Fraulob, V., Garnier, J.M., Chambon, P., and Dolle, P. (2002b). Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech. Dev.* *110*, 165-171.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., 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*, 67-78.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics* *21*, 444-448.
- Niederreither, K., Vermot, J., Fraulob, V., Chambon, P., and Dolle, P. (2002c). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)- independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 16111-16116.

- Niederreither,K., Vermot,J., Messaddeq,N., Schuhbaur,B., Chambon,P., and Dolle,P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128, 1019-1031.
- Niederreither,K., Vermot,J., Schuhbaur,B., Chambon,P., and Dolle,P. (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127, 75-85.
- Niederreither,K., Vermot,J., Schuhbaur,B., Chambon,P., and Dolle,P. (2002d). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development* 129, 3563-3574.
- Niessing,D., Dostatni,N., Jackle,H., and Rivera-Pomar,R. (1999). Sequence interval within the PEST motif of Bicoid is important for translational repression of caudal mRNA in the anterior region of the *Drosophila* embryo. *EMBO Journal* 18, 1966-1973.
- Nieuwkoop,P.D. (1999). The neural induction process; its morphogenetic aspects. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 615-623.
- Nolte,C., Amores,A., Nagy,K.E., Postlethwait,J., and Featherstone,M. (2003). The role of a retinoic acid response element in establishing the anterior neural expression border of *Hoxd4* transgenes. *Mech. Dev.* 120, 325-335.
- Nolte,R.T., Wisely,G.B., Westin,S., Cobb,J.E., Lambert,M.H., Kurokawa,R., Rosenfeld,M.G., Willson,T.M., Glass,C.K., and Milburn,M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-143.
- Nonchev,S., Vesque,C., Maconochie,M., Seitanidou,T., Ariza-McNaughton,L., Frain,M., Marshall,H., Sham,M.H., Krumlauf,R., and Charnay,P. (1996). Segmental expression of *Hoxa-2* in the hindbrain is directly regulated by *Krox-20*. *Development* 122, 543-554.
- Northrop,J.L. and Kimelman,D. (1994). Dorsal-ventral differences in *Xcad-3* expression in response to FGF-mediated induction in *Xenopus*. *Developmental Biology* 161, 490-503.
- Nowicki,J.L. and Burke,A.C. (2000). *Hox* genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* 127, 4265-4275.
- Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Oosterveen,T., Niederreither,K., Dolle,P., Chambon,P., Meijlink,F., and Deschamps,J. (2003). Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' *Hoxb* genes in posterior hindbrain. *EMBO J.* 22, 262-269.

- Otting, G., Qian, Y.Q., Muller, M., Affolter, M., Gehring, W., and Wuthrich, K. (1988). Secondary structure determination for the Antennapedia homeodomain by nuclear magnetic resonance and evidence for a helix-turn-helix motif. *EMBO J.* 7, 4305-4309.
- Packer, A.I., Crotty, D.A., Elwell, V.A., and Wolgemuth, D.J. (1998). Expression of the murine *Hoxa4* gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* 125, 1991-1998.
- Penkov, D., Tanaka, S., Di Rocco, G., Berthelsen, J., Blasi, F., and Ramirez, F. (2000). Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J. Biol. Chem.* 275, 16681-16689.
- Pepe, I.M., Cugnoli, C., Peluso, M., Vergani, L., and Boero, A. (1987). Structure of a protein catalyzing the formation of 11 cis-retinal in the visual cycle of invertebrate eyes. *Cell Biophys.* 10, 15-22.
- Percival-Smith, A., Muller, M., Affolter, M., and Gehring, W.J. (1990). The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains. *EMBO J.* 9, 3967-3974.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13, 3198-3208.
- Perlmann, T. (2002). Retinoid metabolism: a balancing act. *Nature Genetics* 31, 7-8.
- Perlmann, T. and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptors in Sicily: all in the famiglia. *Cell* 90, 391-397.
- Perlmann, T., Rangarajan, P.N., Umesono, K., and Evans, R.M. (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7, 1411-1422.
- Perris, R. and Perissinotto, D. (2000). Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev* 95, 3-21.
- Petkovich, M., Brand, N.J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Phelan, M.L., Rambaldi, I., and Featherstone, M.S. (1995). Cooperative interactions between hox and pbx proteins mediated by a conserved peptide motif. *Molecular & Cellular Biology* 15, 3989-3997.
- Pijnappel, W.W., Folkers, G.E., de Jonge, W.J., Verdegem, P.J., de Laat, S.W., Lugtenburg, J., Hendriks, H.F., van der Saag, P.T., and Durston, A.J. (1998). Metabolism to a response

- pathway selective retinoid ligand during axial pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 15424-15429.
- Piper, D.E., Batchelor, A.H., Chang, C.P., Cleary, M.L., and Wolberger, C. (1999). Structure of a *HoxB1*-Pbx1 heterodimer bound to DNA: role of the hexapeptide and a fourth homeodomain helix in complex formation. *Cell* *96*, 587-597.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *7*, 249-258.
- Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., and Dodd, J. (1990). Mesodermal control of neural cell identity: floor plate induction by the notochord. *Science* *250*, 985-988.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., and Chassande, O. (2001). Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol. Cell Biol.* *21*, 4761-4772.
- Pollard, S.L. and Holland, P.W. (2000). Evidence for 14 homeobox gene families in human genome ancestry. *Curr. Biol.* *10*, 1059-1062.
- Popperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S.K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R.S., and Krumlauf, R. (1995). Segmental expression of *Hoxb-1* is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell* *81*, 1031-1042.
- Popperl, H. and Featherstone, M.S. (1993). Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine *Hox-4.2* gene. *Molecular & Cellular Biology* *13*, 257-265.
- Poux, S., Horard, B., Sigrist, C.J., and Pirrotta, V. (2002). The *Drosophila* trithorax protein is a coactivator required to prevent re-establishment of polycomb silencing. *Development* *129*, 2483-2493.
- Pownall, M.E., Tucker, A.S., Slack, J.M., and Isaacs, H.V. (1996). eFGF, *Xcad3* and *Hox* genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* *122*, 3881-3892.
- Predki, P.F., Zamble, D., Sarkar, B., and Giguere, V. (1994). Ordered binding of retinoic acid and retinoid-X receptors to asymmetric response elements involves determinants adjacent to the DNA-binding domain. *Mol. Endocrinol.* *8*, 31-39.
- Prinos, P., Joseph, S., Oh, K., Meyer, B.I., Gruss, P., and Lohnes, D. (2001). Multiple pathways governing *Cdx1* expression during murine development. *Dev. Biol.* *239*, 257-269.

- Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Quadro,L., Blaner,W.S., Salchow,D.J., Vogel,S., Piantedosi,R., Gouras,P., Freeman,S., Cosma,M.P., Colantuoni,V., and Gottesman,M.E. (1999). Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J.* 18, 4633-4644.
- Rachez,C., Gamble,M., Chang,C.P., Atkins,G.B., Lazar,M.A., and Freedman,L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol. Cell Biol.* 20, 2718-2726.
- Rachez,C., Suldan,Z., Ward,J., Chang,C.P., Burakov,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 12, 1787-1800.
- Ramirez-Solis,R., Zheng,H., Whiting,J., Krumlauf,R., and Bradley,A. (1993). *Hoxb-4* (*Hox-2.6*) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 73, 279-294.
- Rauskolb,C., Smith,K.M., Peifer,M., and Wieschaus,E. (1995). extradenticle determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development* 121, 3663-3673.
- Ray,W.J., Bain,G., Yao,M., and Gottlieb,D.I. (1997). CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J. Biol. Chem.* 272, 18702-18708.
- Renaud,J.P., Rochel,N., Ruff,M., Vivat,V., Chambon,P., Gronemeyer,H., and Moras,D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-689.
- Ribeiro,R.C., Feng,W., Wagner,R.L., Costa,C.H., Pereira,A.C., Apriletti,J.W., Fletterick,R.J., and Baxter,J.D. (2001). Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 14987-14995.
- Rieckhof,G.E., Casares,F., Ryoo,H.D., Abu-Shaar,M., and Mann,R.S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91, 171-183.
- Rivera-Pomar,R., Lu,X., Perrimon,N., Taubert,H., and Jackle,H. (1995). Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* 376, 253-256.

- Rivera-Pomar,R., Niessing,D., Schmidt-Ott,U., Gehring,W.J., and Jackle,H. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. [see comments.]. *Nature* 379, 746-749.
- Rochette-Egly,C., Plassat,J.L., Taneja,R., and Chambon,P. (2000). The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol. Endocrinol.* 14, 1398-1410.
- Roelen,B.A., de Graaff,W., Forlani,S., and Deschamps,J. (2002). *Hox* faisceau polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of faisceaued *Hox* genes in the mouse. *Mech. Dev.* 119, 81.
- Rossant,J. (2001). Stem cells from the mammalian blastocyst [Review]. *Stem Cells* 19, 477-482.
- Rossant,J., Zirngibl,R., Cado,D., Shago,M., and Giguere,V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 1333-1344.
- Ruberte,E., Friederich,V., Morriss-Kay,G., and Chambon,P. (1992). Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 115, 973-987.
- Rubin,D.M., Coux,O., Wefes,I., Hengartner,C., Young,R.A., Goldberg,A.L., and Finley,D. (1996). Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* 379, 655-657.
- Saitou,M., Narumiya,S., and Kakizuka,A. (1994). Alteration of a single amino acid residue in retinoic acid receptor causes dominant-negative phenotype. *J. Biol. Chem.* 269, 19101-19107.
- Sakaguchi,T., Gu,X., Golden,H.M., Suh,E., Rhoads,D.B., and Reinecker,H.C. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. *J. Biol. Chem.* 277, 21361-21370.
- Sakai,Y., Meno,C., Fujii,H., Nishino,J., Shiratori,H., Saijoh,Y., Rossant,J., and Hamada,H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15, 213-225.
- Sanchez-Herrero,E., Vernos,I., Marco,R., and Morata,G. (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature* 313, 108-113.

Sapin,V., Ward,S.J., Bronner,S., Chambon,P., and Dolle,P. (1997). Differential expression of transcripts encoding retinoid binding proteins and retinoic acid receptors during placentation of the mouse. *Dev. Dyn.* 208, 199-210.

Sasai,Y. and De Robertis,E.M. (1997). Ectodermal patterning in vertebrate embryos. *Dev Biol.* 182, 5-20.

Schule,R., Rangarajan,P., Kliewer,S., Ransone,L.J., Bolado,J., Yang,N., Verma,I.M., and Evans,R.M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.

Schwartz,J.A., Zhong,L., Deighton-Collins,S., Zhao,C., and Skafar,D.F. (2002). Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J. Biol. Chem.* 277, 13202-13209.

Scott,M.P., Tamkun,J.W., and Hartzell,G.W., III (1989). The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta* 989, 25-48.

Seol,W., Mahon,M.J., Lee,Y.K., and Moore,D.D. (1996). Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Mol. Endocrinol.* 10, 1646-1655.

Shanmugam,K., Green,N.C., Rambaldi,I., Saragovi,H.U., and Featherstone,M.S. (1999). PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol. Cell Biol.* 19, 7577-7588.

Shao,W., Rosenauer,A., Mann,K., Chang,C.P., Rachez,C., Freedman,L.P., and Miller,W.H., Jr. (2000). Ligand-inducible interaction of the DRIP/TRAP coactivator complex with retinoid receptors in retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 96, 2233-2239.

Shen,W.F., Montgomery,J.C., Rozenfeld,S., Moskow,J.J., Lawrence,H.J., Buchberg,A.M., and Largman,C. (1997). AbdB-like *Hox* proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol. Cell Biol.* 17, 6448-6458.

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

Sheppard,H.M., Harries,J.C., Hussain,S., Bevan,C., and Heery,D.M. (2001). Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol. Cell Biol.* 21, 39-50.

- Shi, Y., Downes, M., Xie, W., Kao, H. Y., Ordentlich, P., Tsai, C. C., Hon, M., and Evans, R. M. (2001). Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev.* 15, 1140-1151.
- Shum, A. S., Poon, L. L., Tang, W. W., Koide, T., Chan, B. W., Leung, Y. C., Shiroishi, T., and Copp, A. J. (1999). Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 84, 17-30.
- Simeone, A., Acampora, D., Arcioni, L., Andrews, P. W., Boncinelli, E., and Mavilio, F. (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 346, 763-766.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.
- Stern, C. D. (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 92-98.
- Stockdale, F. E., Nikovits, W., Jr., and Christ, B. (2000). Molecular and cellular biology of avian somite development. *Dev Dyn.* 219, 304-321.
- Stoner, C. M. and Gudas, L. J. (1989). Mouse cellular retinoic acid binding protein: cloning, complementary DNA sequence, and messenger RNA expression during the retinoic acid-induced differentiation of F9 wild type and RA-3-10 mutant teratocarcinoma cells. *Cancer Res.* 49, 1497-1504.
- Struhl, G. (1981). A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature* 292, 635-638.
- Studer, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F. M., Chambon, P., and Krumlauf, R. (1998). Genetic interactions between *Hoxa1* and *Hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125, 1025-1036.
- Subramanian, V., Meyer, B. I., and Gruss, P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of *Hox* genes. *Cell* 83, 641-653.
- Sucov, H. M., Izpisua-Belmonte, J. C., Ganan, Y., and Evans, R. M. (1995). Mouse embryos lacking RXR alpha are resistant to retinoic-acid-induced limb defects. *Development* 121, 3997-4003.
- Suh, E., Chen, L., Taylor, J., and Traber, P. G. (1994). A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell Biol.* 14, 7340-7351.

Sundaram,M., Sivaprasadarao,A., DeSousa,M.M., and Findlay,J.B. (1998). The transfer of retinol from serum retinol-binding protein to cellular retinol-binding protein is mediated by a membrane receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 3336-3342.

Suzuki,M., Mizutani-Koseki,Y., Fujimura,Y., Miyagishima,H., Kaneko,T., Takada,Y., Akasaka,T., Tanzawa,H., Takihara,Y., Nakano,M., Masumoto,H., Vidal,M., Isono,K., and Koseki,H. (2002). Involvement of the Polycomb-group gene *Ring1B* in the specification of the anterior-posterior axis in mice. *Development* 129, 4171-4183.

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

Tahayato,A., Dolle,P., and Petkovich,M. (2003). *Cyp26C1* encodes a novel retinoic acid-metabolizing enzyme expressed in the hindbrain, inner ear, first branchial arch and tooth buds during murine development. *Gene Expr. Patterns.* 3, 449-454.

Taimi,M., Helvig,C., Wisniewski,J., Ramshaw,H., White,J., Amad,M., Korczak,B., and Petkovich,M. (2003). A novel human cytochrome P450, *CYP26C1* involved in metabolism of 9-cis and all-trans, isomers of retinoic acid. *J. Biol. Chem.*

Takada,S., Stark,K.L., Shea,M.J., Vassileva,G., McMahon,J.A., and McMahon,A.P. (1994). *Wnt-3a* regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* 8, 174-189.

Tam,P.P.L., Goldman,D., Camus,A., and Schoenwolf,G.C. (2000). Early events of somitogenesis in higher vertebrates: Allocation of precursor cells during gastrulation and the organization of a meristic pattern in the paraxial mesoderm [Review]. *CURRENT TOPICS IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY, VOL 47 : SOMITOGENESIS, PT 1* 47, 1-32.

Tamarin,A., Crawley,A., Lee,J., and Tickle,C. (1984). Analysis of upper beak defects in chicken embryos following with retinoic acid. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 84, 105-123.

Tanaka,S., Kunath,T., Hadjantonakis,A.K., Nagy,A., and Rossant,J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by *FGF4*. *Science* 282, 2072-2075.

Tasset,D., Tora,L., Fromental,C., Scheer,E., and Chambon,P. (1990). Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 62, 1177-1187.

Taylor,J.K., Boll,W., Levy,T., Suh,E., Siang,S., Mantei,N., and Traber,P.G. (1997a). Comparison of intestinal phospholipase A/lysophospholipase and sucrase-isomaltase genes

- suggest a common structure for enterocyte-specific promoters. *DNA & Cell Biology* 16, 1419-1428.
- Taylor, J.K., Levy, T., Suh, E.R., and Traber, P.G. (1997b). Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res.* 25, 2293-2300.
- Thaller, C., Hofmann, C., and Eichele, G. (1993). 9-cis-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplications in the chick wing bud. *Development* 118, 957-965.
- Thompson, J.N., Howell, J.M., and Pitt, G.A.J. (1964). Vitamin A and reproduction in rats. *Proc. Royal. Soc.* 159, 510-535.
- Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., and Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated *Hoxa9* gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99, 121-129.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., Hough, M.R., Dragowska, W., Lansdorp, P.M., Lawrence, H.J., Largman, C., and Humphries, R.K. (1997). Overexpression of *HOXA10* in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.* 17, 495-505.
- Tickle, C. and Munsterberg, A. (2001). Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 11, 476-481.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., and Chambon, P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333, 185-188.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387, 677-684.
- Trinh, K.Y., Jin, T., and Drucker, D.J. (1999). Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein *Cdx-3*. *J. Biol. Chem.* 274, 6011-6019.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451-486.
- Umesono, K. and Evans, R.M. (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57, 1139-1146.

- Umesono, K., Giguere, V., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336, 262-265.
- van Den Akker E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B.I., and Deschamps, J. (2002). Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129, 2181-2193.
- van Der Hoeven F., Zakany, J., and Duboule, D. (1996). Gene transpositions in the *HoxD* complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell* 85, 1025-1035.
- van Der, H.F., Zakany, J., and Duboule, D. (1996). Gene transpositions in the *HoxD* complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell* 85, 1025-1035.
- van Dijk, M.A., Peltenburg, L.T., and Murre, C. (1995). *Hox* gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2. *Mech. Dev.* 52, 99-108.
- Vasiliauskas, D. and Stern, C.D. (2001). Patterning the embryonic axis: FGF signaling and how vertebrate embryos measure time. *Cell* 106, 133-136.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 507-519.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.
- Vonesch, J.L., Nakshatri, H., Philippe, M., Chambon, P., and Dolle, P. (1994). Stage and tissue-specific expression of the alcohol dehydrogenase 1 (*Adh-1*) gene during mouse development. *Dev. Dyn.* 199, 199-213.
- Wagner, M., Han, B., and Jessell, T.M. (1992). Regional differences in retinoid release from embryonic neural tissue detected by an in vitro reporter assay. *Development* 116, 55-66.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293, 853-857.
- Wang, J., Mager, J., Schnedier, E., and Magnuson, T. (2002). The mouse PcG gene *eed* is required for *Hox* gene repression and extraembryonic development. *Mamm. Genome* 13, 493-503.

- Waring,D.A. and Kenyon,C. (1991). Regulation of cellular responsiveness to inductive signals in the developing *C. elegans* nervous system. *Nature* 350, 712-715.
- Wasiak,S. and Lohnes,D. (1999). Retinoic acid affects left-right patterning. *Dev Biol.* 215, 332-342.
- Wei,L.N., Blaner,W.S., Goodman,D.S., and Nguyen-Huu,M.C. (1989). Regulation of the cellular retinoid-binding proteins and their messenger ribonucleic acids during P19 embryonal carcinoma cell differentiation induced by retinoic acid. *Mol. Endocrinol.* 3, 454-463.
- Wendling,O., Ghyselinck,N.B., Chambon,P., and Mark,M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 128, 2031-2038.
- Weston,A.D., Blumberg,B., and Underhill,T.M. (2003). Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *J. Cell Biol.* 161, 223-228.
- Weston,A.D., Chandraratna,R.A.S., Torchia,J., and Underhill,T.M. (2002). Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. *Journal of Cell Biology* 158, 39-51.
- White,J.A., Guo,Y.D., Baetz,K., Beckett-Jones,B., Bonasoro,J., Hsu,K.E., Dilworth,F.J., Jones,G., and Petkovich,M. (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 29922-29927.
- White,J.A., Ramshaw,H., Taimi,M., Stangle,W., Zhang,A., Everingham,S., Creighton,S., Tam,S.P., Jones,G., and Petkovich,M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6403-6408.
- Wilder,E.L. and Perrimon,N. (1995). Dual functions of wingless in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* 121, 477-488.
- Wilson,J.N., Roth,C.B., and Warkany,J. (1953). An analysis of the syndrome of maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of Vitamin A at various time during gestation. *Am. J. Anat.* 92, 189-217.
- Wolbach,S.B. and Howe,P.R. (1978). Nutrition Classics. The Journal of Experimental Medicine 42: 753-77, 1925. Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. S. Burt Wolbach and Percy R. Howe. *Nutr. Rev.* 36, 16-19.

- Wolgemuth,D.J., Viviano,C.M., Gizang-Ginsberg,E., Frohman,M.A., Joyner,A.L., and Martin,G.R. (1987). Differential expression of the mouse homeobox-containing gene *Hox-1.4* during male germ cell differentiation and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 5813-5817.
- Wong,C.W. and Privalsky,M.L. (1998). Transcriptional silencing is defined by isoform- and heterodimer-specific interactions between nuclear hormone receptors and corepressors. *Mol. Cell Biol.* 18, 5724-5733.
- Wu,K. and Wolgemuth,D.J. (1993). Protein product of the somatic-type transcript of the *Hoxa-4* (*Hox-1.4*) gene binds to homeobox consensus binding sites in its promoter and intron. *J. Cell Biochem.* 52, 449-462.
- Xu,F., Li,H., and Jin,T. (1999). Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene *Cdx-2/3*. *J. Biol. Chem.* 274, 34310-34316.
- Xu,W., Angelis,K., Danielpour,D., Haddad,M.M., Bischof,O., Campisi,J., Stavnezer,E., and Medrano,E.E. (2000). Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5924-5929.
- Xue,Y., Wong,J., Moreno,G.T., Young,M.K., Cote,J., and Wang,W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* 2, 851-861.
- Yamada,T., Placzek,M., Tanaka,H., Dodd,J., and Jessell,T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing nervous system: polarizing activity of the floor plate and notochord. *Cell* 64, 635-647.
- Yamaguchi,M., Nakamoto,M., Honda,H., Nakagawa,T., Fujita,H., Nakamura,T., Hirai,H., Narumiya,S., and Kakizuka,A. (1998). Retardation of skeletal development and cervical abnormalities in transgenic mice expressing a dominant-negative retinoic acid receptor in chondrogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7491-7496.
- Yamaguchi,T.P., Harpal,K., Henkemeyer,M., and Rossant,J. (1994). *fgfr-1* is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* 8, 3032-3044.
- Yoshida,A., Rzhetsky,A., Hsu,L.C., and Chang,C. (1998). Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251, 549-557.
- Yu,V.C., Delsert,C., Andersen,B., Holloway,J.M., Devary,O.V., Naar,A.M., Kim,S.Y., Boutin,J.M., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1991). RXR beta: a coregulator that

enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251-1266.

Zakany, J., Gerard, M., Favier, B., and Duboule, D. (1997). Deletion of a *HoxD* enhancer induces transcriptional heterochrony leading to transposition of the sacrum. *EMBO J.* 16, 4393-4402.

Zamir, I., Dawson, J., Lavinsky, R.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Lazar, M.A. (1997). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14400-14405.

Zamir, I., Harding, H.P., Atkins, G.B., Horlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Lazar, M.A. (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol. Cell Biol.* 16, 5458-5465.

Zappavigna, V., Falciola, L., Helmer-Citterich, M., Mavilio, F., and Bianchi, M.E. (1996). HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J.* 15, 4981-4991.

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

Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.M., Ruffenach, F., Leroy, P., and Chambon, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J.* 10, 71-81.

Zhang, F., Nagy, K.E., and Featherstone, M.S. (2000). Murine *hoxd4* expression in the CNS requires multiple elements including a retinoic acid response element. *Mech. Dev.* 96, 79-89.

Zhang, F., Popperl, H., Morrison, A., Kovacs, E.N., Prideaux, V., Schwarz, L., Krumlauf, R., Rossant, J., and Featherstone, M.S. (1997a). Elements both 5' and 3' to the murine *Hoxd4* gene establish anterior borders of expression in mesoderm and neurectoderm. *Mechanisms of Development* 67, 49-58.

Zhang, J., Guenther, M.G., Carthew, R.W., and Lazar, M.A. (1998). Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12, 1775-1780.

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (1997b). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-364.

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

