

Université de Montréal

Cdx-mediated co-integration of Wnt and BMP signals
on a single Pax3 neural crest enhancer

par Emilie Laberge Perrault

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'option du grade de M. Sc.
en Biologie moléculaire
option Maladies complexes chez l'humain

Septembre 2016

© Laberge Perrault, 2016

RÉSUMÉ

Chez les vertébrés, une première ébauche du système nerveux central à partir du neurectoderme est obtenue par la neurulation. Ce processus mène à la formation du tube neural (TN) à partir de la plaque neurale. La neurulation est coordonnée avec l'induction d'une population de cellules multipotentes aux bordures latérales de la plaque neurale: les cellules de la crête neurale (CCNs). Le gène *Pax3* encode un facteur de transcription qui est essentiel pour la formation du TN et des CCNs. Une petite région régulatrice d'environ ~250pb dans le promoteur proximal de *Pax3*, appelée NCE2, est suffisante pour récapituler l'induction de *Pax3* ainsi que sa restriction aux bordures latérales de la plaque neurale. Le NCE2 de *Pax3* est connu pour intégrer des signaux instructifs antéropostérieur (AP) provenant de la voie Wnt, via les protéines CDX (CDX 1, 2, 4), pouvant induire l'expression de *Pax3* dans la plaque neurale postérieure (PNP). Nous avons démontré ici que, en plus des signaux AP, le NCE2 de *Pax3* intègre des signaux instructifs dorsoventraux (DV) provenant de la voie BMP, via ses effecteurs SMAD1/5. Nos résultats indiquent que les protéines SMAD1/5 pourraient être le cofacteur manquant dans le contrôle CDX-dépendant de l'expression de *Pax3* et que ce serait ces protéines qui permettraient de conférer le patron d'expression restreint de *Pax3* aux bordures latérales de la PNP. Pour étayer cette affirmation, nous fournissons de nouvelles preuves que l'activité de BMP-SMAD1/5 sur l'expression de *Pax3* est médiée par les CDX. Comme des défauts affectant la formation du TN et des CCNs sont à la base de plusieurs syndromes génétiques et malformations congénitales chez l'humain, nos résultats offrent ainsi une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant ces pathologies.

Mots clés : voie Wnt canonique, voie BMP, *Pax3*, SMAD1/5, crête neurale, souris, tube neural

ABSTRACT

In vertebrates, a first draft of the central nervous system from the neurectoderm is obtained by neurulation. This process leads to the formation of the neural tube (NT) from the neural plate. Neurulation is coordinated with the induction of a population of multipotent cells at the neural plate border: neural crest cells (NCCs). The *Pax3* gene encodes a transcription factor that is essential for the formation of the NT and NCCs. A small regulatory region of ~250bp in the proximal promoter of *Pax3*, called NCE2, is sufficient to recapitulate the induction of *Pax3* and its restriction to the lateral borders of the neural plate. The *Pax3*NCE2 is known to incorporate anterior-posterior (AP) instructive cues from the Wnt pathway, via CDX proteins (CDX1, 2, 4), which can induce the expression of *Pax3* in the posterior neural plate (PNP). We have demonstrated that, in addition to the AP cues, *Pax3*NCE2 integrates instructive dorsal-ventral (DV) cues from the BMP pathway, via SMAD1/5 proteins. Our results indicate that SMAD1/5 proteins could be the missing co-factor in the CDX-dependent expression of *Pax3* that restrict *Pax3* expression to the lateral borders of the PNP. To support this assertion, we provide further evidence that the activity of BMP-SMAD1/5 on the expression of *Pax3* is mediated by CDX proteins. As defects affecting the formation of the NT and NCCs are the basis of many genetic syndromes and birth defects in humans, our results provide a better understanding of the molecular mechanisms underlying these pathologies.

Key words: canonical Wnt signalling, BMP signalling, *Pax3*, SMAD1/5, neural crest, neural tube, mouse

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	X
AVANT-PROPOS	XI
1. INTRODUCTION	1
1.1 Le développement embryonnaire.....	1
1.1.1 <i>De la fécondation à la gastrulation</i>	1
1.1.2 <i>Le développement du système nerveux</i>	4
1.1.2.1 La neurulation	4
1.1.2.2 Les défauts de fermeture du tube neural	6
1.1.2.3 La formation de l'axe antéropostérieure et dorso-ventrale	8
1.1.2.4 Séquence spatio-temporelle de la fermeture du tube neural	11
1.2 La crête neurale.....	13
1.2.1 <i>La crête neurale et ses origines</i>	13
1.2.2 <i>Le GRN : Gene-Regulatory Network</i>	15
1.3 Les voies de signalisation et la crête neurale	16
1.3.1 <i>La voie Wnt et la crête neurale</i>	17
1.3.2 <i>La voie BMP et la crête neurale</i>	20
1.4 PAX3.....	27
1.4.1 <i>L'expression de Pax3</i>	29
1.4.2 <i>Pax3 et ses maladies associées</i>	31
1.4.3 <i>Les régulateurs de la transcription de Pax3</i>	33
1.4.4 <i>Le mécanisme moléculaire de l'induction de Pax3</i>	36
1.5 Hypothèse et objectif	39

1.5.1 <i>Hypothèse</i>	39
1.5.2 <i>Objectif et méthodologie</i>	40
2. ARTICLE	42
Cdx-mediated co-integration of Wnt and BMP signals on a single Pax3 neural crest enhancer	
2.1 Abstract.....	43
2.2 Introduction.....	43
2.3 Experimental procedures	46
2.3.1 Ethics statement.....	46
2.3.2 Plasmid constructs and site-directed mutagenesis.....	47
2.3.3 Immunofluorescence analyses.....	47
2.3.4 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays	48
2.3.5 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA).....	49
2.3.6 Cell culture, transfections and RT-PCR analyses.....	49
2.3.7 Statistical analyses.....	50
2.4 Results.....	50
2.4.1 <i>Pax3</i> and pSMAD1/5 are co-expressed in the caudal neurectoderm	50
2.4.2 Robust activation of <i>Pax3</i> NCE2 requires a positive input from SMAD1/5	51
2.4.3 <i>Pax3</i> activity is enhanced by the BMP-canonical pathway in Wnt3a-treated P19 cells.....	53
2.4.4 SMAD1/5 induced <i>Pax3</i> expression implicates CDX members as mediators.....	54
2.5 Discussion.....	56
2.5.1 SMAD1/5 as the missing co-factor for restricted <i>Pax3</i> expression	56
2.5.2 CDX proteins as mediators of the BMP-SMAD instructive signal.....	57
2.6 Acknowledgments.....	59
2.7 Competing interests	59
2.8 Figures.....	60
2.9 Table	68
3. DISCUSSION/CONCLUSION	69
4. RÉFÉRENCES	75

LISTE DES TABLEAUX

Table I	Oligonucleotides used for PCR and EMSA.....	68
----------------	---------------------------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES

Figure 1.0 Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire jusqu'au début du développement embryonnaire post-implantatoire.....	2
Figure 1.1 Cascade de signalisation pour l'initiation de la formation de la ligne primitive.....	3
Figure 1.2 La gastrulation dans les embryons de souris.....	4
Figure 1.3 La formation du tube neural.....	5
Figure 1.4 Séquence spatio-temporelle de la neurulation dans l'embryon de souris.....	6
Figure 1.5 Défauts de formation du tube neural.....	8
Figure 1.6 Les différentes populations cellulaires dans l'endoderme viscéral.....	10
Figure 1.7 Réseau putatif d'interactions et de régulation de gènes contrôlant la formation de la crête neurale chez les vertébrés.....	14
Figure 1.8 La voie de signalisation Wnt- β -caténine.....	17
Figure 1.9 La voie de signalisation BMP canonique.....	22
Figure 1.10 Le gène <i>Pax3</i> dans le développement de la crête neurale à différents niveaux axiaux.....	29
Figure 1.11 Patron d'expression de <i>Pax3</i> dans les embryons en développement.....	30
Figure 2.0 <i>Pax3</i> and pSMAD1/5 are co-expressed in the caudal neurectoderm during the early steps of neural tube and neural crest cell formation.....	60
Figure 2.1 Schematic representation of the <i>Pax3</i> genomic locus showing the relative position of <i>Pax3</i> regulatory regions.....	61
Figure 2.2 Robust synergistic activation of <i>Pax3</i> NCE2 requires a positive input from SMAD1/5.....	62
Figure 2.3 <i>Pax3</i> activity is enhanced by the BMP canonical pathway.....	63
Figure 2.4 Integration of pSMAD1/5 on the <i>Pax3</i> NCE2 is CDX-mediated.....	64
Figure 2.5 pSMAD1/5 expression pattern in N2a cells.....	65
Figure 2.6 pSMAD1/5 expression pattern in P19 cells.....	66
Figure 2.7 pSMAD1/5 expression pattern in COS7 cells.....	67
Figure 3.0 Modèle pour le contrôle de l'expression de <i>Pax3</i> dans le neurectoderme caudal via le NCE2.....	76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Version française

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMN	Amnion
AP	Antéropostérieur
AR	Acide rétinoïque
BLPN	Bordure latérale de la plaque neurale
CB	Cavité du blastocyste
CCNs	Cellules de la crête neurale
CN	Crête neurale
CPA	Cavité pro-amniotique
DFTN	Défaut de fermeture du tube neural
DV	Dorso-ventral
E	Âge embryonnaire
ECR	Éléments cis-régulateurs
ECT	Ectoderme
ED	Endoderme définitif
ENN	Ectoderme non-neural
EPr	Endoderme primitif
EPI	Épiblaste
EV	Endoderme viscéral
EVA	Endoderme viscéral antérieur
EVD	Endoderme viscéral distal
ExE	Ectoderme extra-embryonnaire
jpc	Jour post-coïtal
LP	Ligne primitive
MCI	Masse de cellule interne
N	Nœud
PD	Proximal-distal
PDLA	Points dorso-latéraux d'articulation
PMA	Point médian d'articulation
PN	Plaque neurale
PNP	Plaque neurale postérieure
PPC	Polarité planaire cellulaire
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TE	Trophectoderme
TEM	Transition épithéliale-mésenchymateuse
TME	Transition mésenchymateuse-épithéliale
TN	Tube neural
ZDLM	Zone dorso-latérale marginale

English version

ActRIIA/B	Activin type II receptors A/B
ALK	Activin receptor-like kinase (Type I BMP receptor)
AP	Anterior-posterior
APC	Adenomatous polyposis <i>coli</i>
BLBP	Brain lipid binding protein
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR1a	Bone morphogenetic protein receptor 1a
BRN	Brain specific homeobox
BS	Binding site
CDX	Caudal-related homeobox
CELSR1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
CER1	Cerberus-like 1
Chordin	BMP antagonist
Co-SMAD4	Coactivator SMAD
Cripto	Cryptic family protein 1B
CRM	Cis-regulatory module
DE	Definitive endoderm
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DLHP	Dorso-lateral hinge points
dpc	Days post-coitum
DV	Dorsal-ventral
DVL1/2	Segment polarity protein dishevelled homolog
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FGF	Fibroblast growth factor
FOXA2	Forkhead box A2
FOXD3	Forkhead box D3
FZD	Frizzled
GRN	Gene-regulatory network
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
I-SMAD	Inhibitory SMADs
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KO	Knockout
Ku	Kumba
LEFTY1	Left-right determination factors
LHX1	LIM homeobox 1
LRP	Low density lipoprotein-related protein
MAD	Mother's against decapentaplegic
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MHP	Median hinge point
MSX	Msh homeobox
NC	Neural crest
NCCs	Neural crest cells
NCE	Neural crest enhancer
NNE	Non-neural ectoderm

NP	Neural plate
NPB	Neural plate border
NT	Neural tube
NTD	Neural tube defect
OCT3/4	Octomer-binding transcription factor 3/4
ORF	Open reading frame
OXT2	Orthodenticle homeobox 2
PAX3	Paired-box 3
PCP	Planar cell polarity
PD	Proximal-distal
PNP	Posterior neural plate
POU	Derived from P ituitary-specific Pit-1, O ctamer transcription factor, neural U nc-86 transcription factor
PrE	Primitive endoderm
pSMAD	phosphorylated-R-SMAD
PTC1	Type two C phosphatase
R-SMAD	Receptor SMAD
RA	Retinoic acid
sFRP	soluble Frizzled-related proteins
Shh	Sonic hedgehog
SMAD	Contraction of Sma – small body size protein and Mad (mother's against decapentaplegic)
SOX	SRY (Sex determining region Y)-box
Sp	Spotch
TCF/LEF	T-cell factor/Lymphoid enhancer binding factor
TE	Trophectoderm
TEAD	TEA domain transcription factor
TGF- β	Transforming growth factor β
WIF1	Wnt inhibitory factor 1
Wnt	Wingless/int1-related
VANGL2	Van Gogh-like protein 2
ZIC	Zinc finger of the cerebellum

REMERCIEMENTS

Le principal remerciement revient à Nicolas Pilon, mon directeur de mémoire, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il m'a donné la chance de travailler sur ce projet. Il a su me guider tout au long de ce projet de recherche et il m'a permis de persévérer malgré des débuts difficiles. Je serai toujours reconnaissante pour toutes les nouvelles notions et leçons qu'il m'a permis d'apprendre durant mes années dans son laboratoire.

Ma vie a été rattachée à ce laboratoire ces dernières années et je ne saurais exprimer le bonheur que j'ai vécu avec mes collègues, durant ces années au laboratoire. Au-delà de l'aide qu'ils m'ont apportée pour discuter et perfectionner mes expériences, ils ont su créer une ambiance dans le labo qui ne saurait être égale nulle part ailleurs. Je pense à vous, Rodolphe, Chloé, Tatiana, Guillaume et Daniel, pour qui je verse une larme de joie en repensant à tous les moments que nous avons passés ensemble.

Je remercie mes parents qui, encore aujourd'hui, même à 26 ans, sont toujours plus qu'intéressés par ce que je fais et toujours les premiers à offrir leur aide, notamment lorsqu'il est question de corriger les quelques petites fautes que je fais en écrivant...

Ma liste de sigles et d'abréviations n'aurait pas été la même sans toi, Lou.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire est rédigé par article et de ce fait il est écrit en français et en anglais. Par souci de cohérence entre les langues, les sigles et les abréviations des mots cités dans le corps de l'ouvrage (l'article) seront écrits sous leur forme anglaise tandis que les sigles et abréviations qui se retrouvent dans le reste de l'ouvrage seront écrites sous leur forme française, lorsque possible. À cause de ceci, nous retrouvons ainsi une version française et une version anglaise de la rubrique « Liste des sigles et abréviations ». Afin de simplifier les listes, les noms de gènes, de protéines, de récepteurs etc. seront seulement présents dans la version anglaise.

1. INTRODUCTION

1.1. Le développement embryonnaire

L'embryogenèse est le processus de formation d'un organisme pluricellulaire complet, à partir d'une seule cellule fécondée. Durant cette période, des axes de polarité apparaissent – antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV) – et la formation des trois feuillets embryonnaires pendant la gastrulation, soit l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme, permet d'organiser et de sculpter l'embryon en développement.

1.1.1. *De la fécondation à la gastrulation*

Tel que représenté à la Figure **1.0**, durant la première semaine de l'embryogenèse, l'embryon de souris passe à travers plusieurs différents stades, de la fécondation à la gastrulation (E0,5 à E 7,5) [1]¹. Au jour E3,5 il y a formation du blastocyste. Le blastocyste s'implante dans la paroi utérine à partir de E6,0 et s'ensuit alors la prochaine étape du développement : la gastrulation .

La gastrulation a pour but de générer les axes du corps qui serviront de modèle pour la morphogenèse ultérieure de l'embryon. C'est un processus morphogénétique qui résulte en la formation d'un embryon composé de trois feuillets embryonnaires – l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme – qui vont former l'entièreté de l'animal adulte [2]. La gastrulation commence par une pénétration cellulaire dans une région postérieure de l'embryon, soit à la ligne primitive (LP). La LP est apparente à partir de E6,5 (Figure **1.0**). La LP apparaît au stade préliminaire de la gastrulation, dans une région postérieure de l'épiblaste (EPI), près de la jonction embryonnaire-extraembryonnaire [2] (Figure **1.0**). Des études ont mis en évidence la signalisation clé des voies de signalisation Nodal et Wnt3a dans l'induction de la LP [3] (Figure **1.1**). Un réseau de signalisation, médié par la cascade de signalisation *Bmp4-Wnt3-Nodal*, implique qu'une activité de rétroaction entre l'ectoderme extra-embryonnaire (ExE) et

¹ Comme le moment précis de la fécondation ne peut être établi chez la souris, l'âge embryonnaire est donc déterminé par la détection d'un bouchon de copulation, auquel on ajoute un laps de temps d'une demi-journée afin de tenir compte du fait qu'elles sont actives pendant la nuit. Ainsi, l'âge embryonnaire est appelé jour postcoïtal ou âge embryonnaire (E).

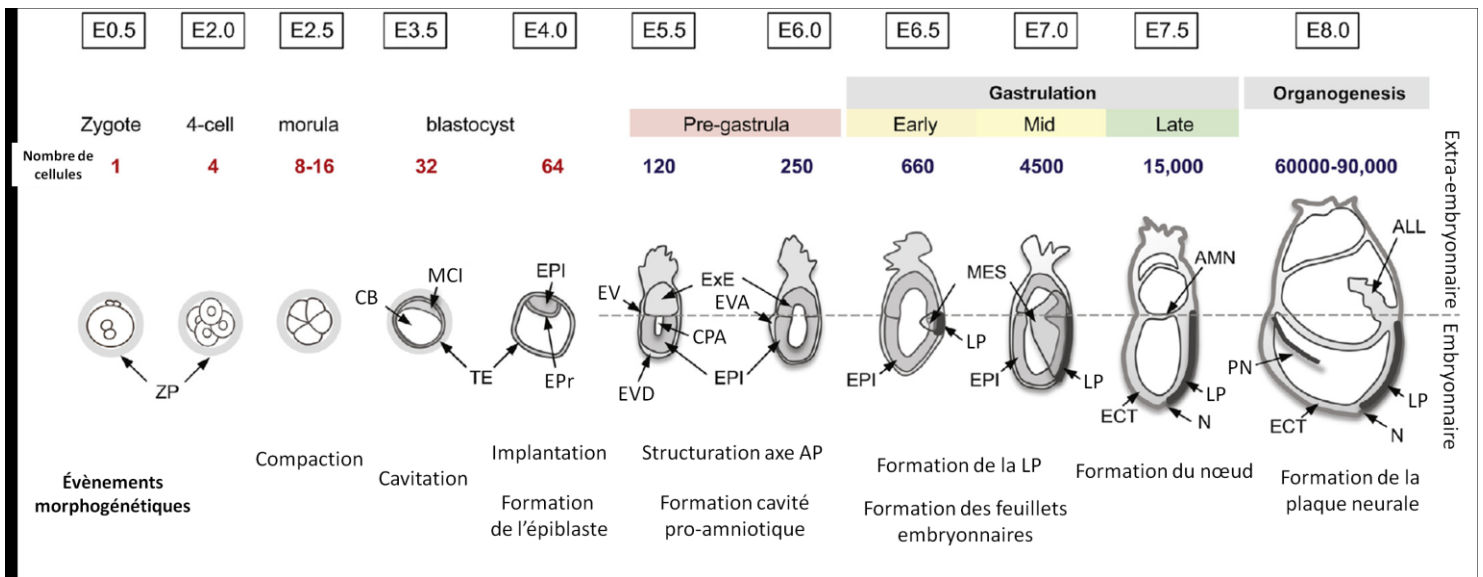


Figure 1.0 Chronologie du développement embryonnaire préimplantatoire jusqu’au début du développement embryonnaire post-implantatoire

Représentation schématique qui illustre les caractéristiques anatomiques de l’embryon de souris aux stades E0,5 à E8,5. Adapté de Kojima *et al*, 2014 [1]. Schéma représentant le nombre moyen de cellules dans l’embryon en entier (de E0,5 à E4,5) ou dans l’épiblaste et les feuilletts embryonnaires (de E5,5 à E8,5) ainsi que les évènements morphologiques importants à chaque stade. AMN: amnion, EVA: endoderme viscéral antérieur, CB: cavité du blastocyste, EVD endoderme viscéral distal, ECT: ectoderm, EPI: épiblaste, ExE: ectoderme extra-embryonnaire, MCI: masse de cellules internes, N: nœud, PN: pli neuronal, CPA : cavité pro-amniotique, EPr: endoderm primitif, LP: ligne primitive, TE: trophoctoderm, EV: endoderm viscéral.

l’EPI (Nodal envoie des signaux à l’ExE afin d’activer l’expression de Bmp4 et Bmp4 envoie des signaux à l’EPI pour activer les marqueurs moléculaires de la LP comme Wnt3) est nécessaire pour la formation de la LP, car les mutants dépourvus de ces trois voies de signalisation ne forment pas de LP [4-7]. À mesure que la gastrulation progresse, la LP s’allonge. Au stade tardif de la gastrulation, la LP s’étend jusqu’à l’extrémité distale du cylindre, où est formé le nœud (Figure 1.0). La LP est une structure qui est en constante évolution; les cellules prolifèrent continuellement ce qui permet à la LP de s’allonger de l’épiblaste proximal-postérieur jusqu’à ce qu’elle atteigne la pointe distale de l’embryon à E7,5. Cette LP génère une série ordonnée de lignées cellulaires distinctes. Les cellules adoptent des destins différents selon le moment où elles quittent la LP car la répartition de ces cellules se déroule dans une séquence antérieure à postérieure, déterminée par le temps et la position de la cellule au moment où elle pénètre dans la LP [3, 8]. Ceci veut dire que la partie plus antérieure de l’embryon, la tête, est plus vieille que les parties plus postérieures du tronc. Les tissus situés dans la partie la plus antérieure se différencient donc plus tôt. C’est au niveau de la LP et du nœud, les « organisateurs » de la gastrula chez l’embryon de souris [8] (Figure 1.0), qu’il y a des changements morphologiques qui permettront ainsi aux cellules de pénétrer dans la LP afin de pouvoir former les feuilletts embryonnaires [1, 3, 4, 7]. Ce sont les cellules

de l'EPI au niveau de la LP qui subissent une transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) et pénètrent entre l'EPI et l'endoderme viscéral (EV) afin de former l'endoderme définitif (ED) et par la suite le mésoderme (Figure 1.2). Les cellules vouées à devenir de l'ED migrent individuellement de manière antérieure et latérale et subissent une transition mésenchymateuse-épithéliale (TME) et s'intercalent dans l'EV. Les cellules s'intercalent individuellement, générant une mosaïque de cellule de lignée EV ou ED. Les cellules de l'ED donneront lieux, entre autres, aux épithéliums qui tapissent les voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal et la vessie. Les cellules du mésoderme peuvent migrer de deux manières; de manière proximale pour former le mésoderme extra-embryonnaire ou de manière latérale et antérieure. Les cellules du mésoderme donneront lieux, entre autres, à la notochorde, aux somites (qui formeront notamment les muscles squelettiques et la colonne vertébrale), aux reins et aux vaisseaux sanguins. Les cellules restantes de l'EPI formeront l'ectoderme [2-4]. L'ectoderme se différenciera afin de former, entre autres, le système nerveux central (SNC) (cerveau et moelle épinière), le système nerveux périphérique (SNP) et l'épiderme.

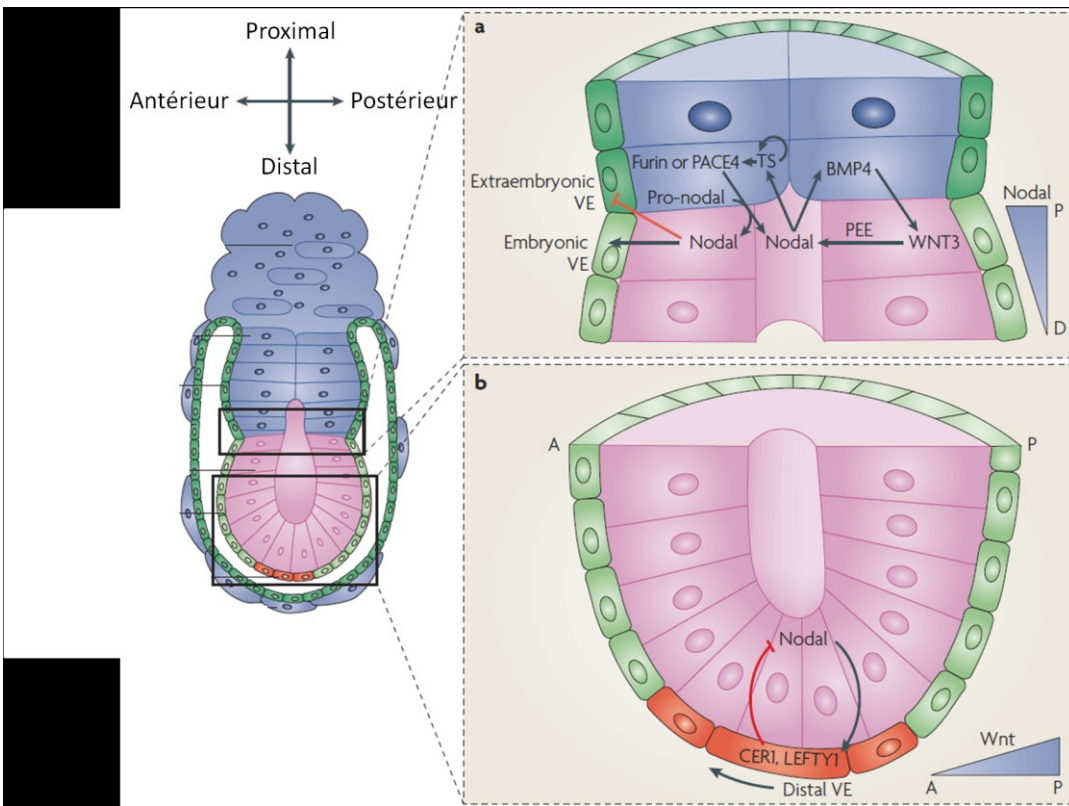


Figure 1.1 Cascade de signalisation pour l'initiation d la formation de la ligne primitive
Adapté de Arnold et Robertson, 2009 [7]. Un réseau de signalisation, médié par la cascade de signalisation *Bmp4-Wnt3-Nodal*, est nécessaire pour la formation de la LP.

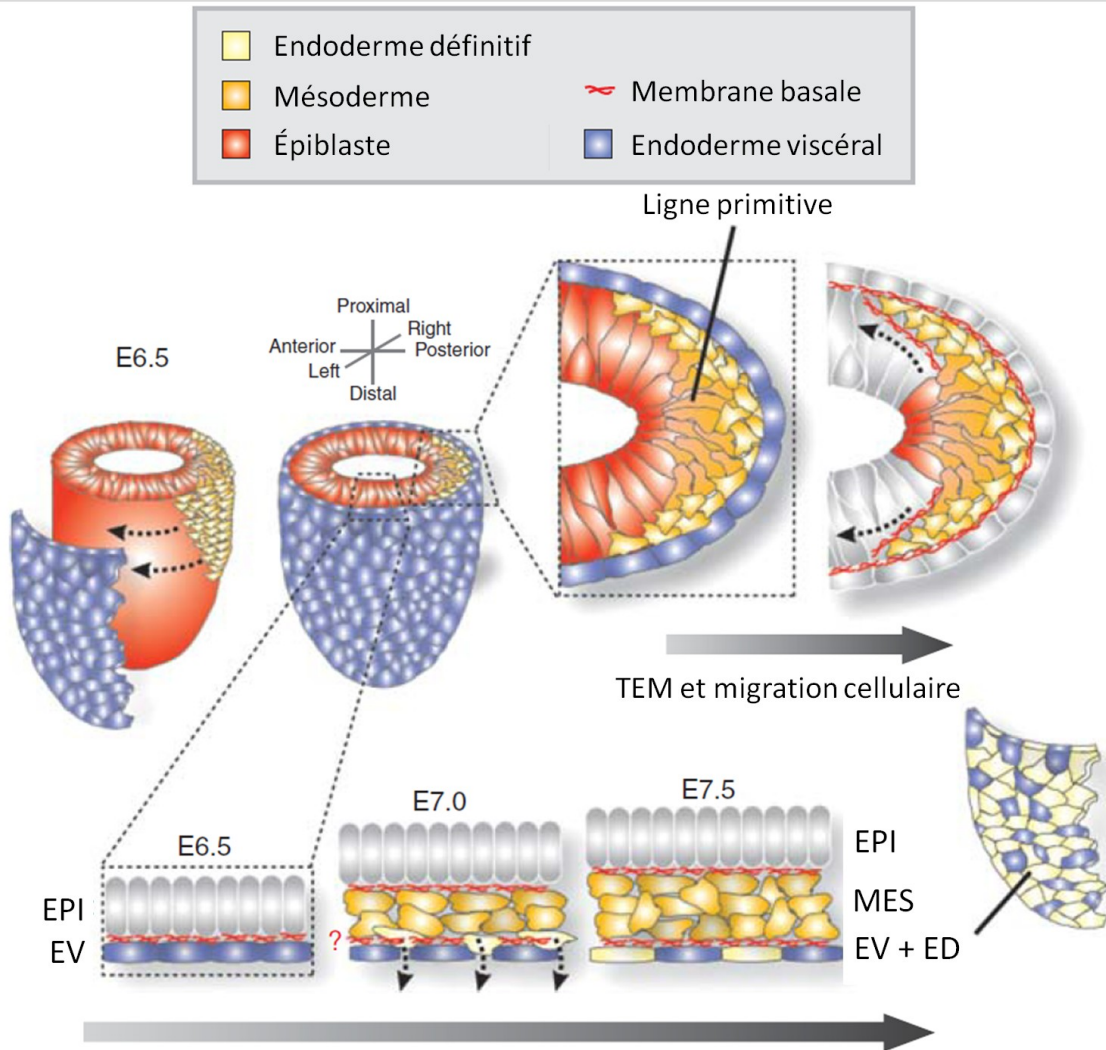


Figure 1.2 La gastrulation dans les embryons de souris

Schéma qui dépeint le comportement cellulaire morphogénique lors de la formation des feuillets embryonnaires. Adapté de Rivera-Pérez et Hadjantonakis, 2014 [3]. Les cellules de l'EPI, au niveau de la LP, subissent une TEM et pénètrent entre l'EPI et l'EV afin de former l'ED et par la suite le mésoderme. Les cellules vouées à devenir de l'ED migrent antérieurement et latéralement et subissent une TME et s'intercalent dans l'EV.

1.1.2. Le développement du système nerveux

1.1.2.1. La neurulation

Après la gastrulation survient la neurulation. La neurulation met en place le SNC et donc la neurulation culmine en la formation du tube neural (TN), précurseur du cerveau et de la moelle épinière. Au départ il s'agit d'une plaque neurale, région spécialisée de l'ectoderme, qui forme à sa jonction avec l'ectoderme non-neural (ENN), des plis neuraux bilatéraux. Ces plis vont s'élever, s'apposer et se fusionner afin de former le TN qui sera recouvert

d'ectoderme épidermique [9] (Figure 1.3). La neurulation se produit en deux étapes, soit la neurulation primaire et la neurulation secondaire. La neurulation primaire se produit comme décrit ci-haut et forme le cerveau et la majorité de la moelle épinière, et se termine vers E10. La neurulation secondaire se fait à l'extrémité caudale, au bourgeon de la queue, sans qu'il y ait élévation et apposition des plis neuraux. Le bourgeon de la queue comprend une population de cellules souches qui représente les vestiges de la LP. Le TN secondaire se ferme par épithélialisation des cellules mésenchymateuses, dont la lumière du tube est la continuité de celle issue de la neurulation primaire. Cette neurulation secondaire forme la majorité de la portion sacrale et toute la région coccygienne [9, 10]. La fermeture du TN est discontinue: elle s'amorce à 2 ou 3 sites le long de l'axe du corps (Figure 1.4a). Au site de la première fermeture, soit la frontière entre le rhombencéphale et le reste du cerveau, la fusion du TN se fait en même temps dans deux directions (de manière rostrale et caudale), soit vers le cerveau primitif et les régions spinales, jusqu'à la fermeture des neuropores antérieurs et postérieurs (région ouverte des plis neuraux). Le site de la fermeture 2 est la frontière entre le prosencéphale et le mésencéphale et le site de la fermeture 3 se fait à l'extrémité rostrale du prosencéphale [9]. Toutefois, le site de la fermeture 2 est variable chez la souris, absente chez certaines, retrouvée de manière plus caudale ou plus rostrale chez d'autres, tout comme chez l'humain [10] (Figure 1.4a).

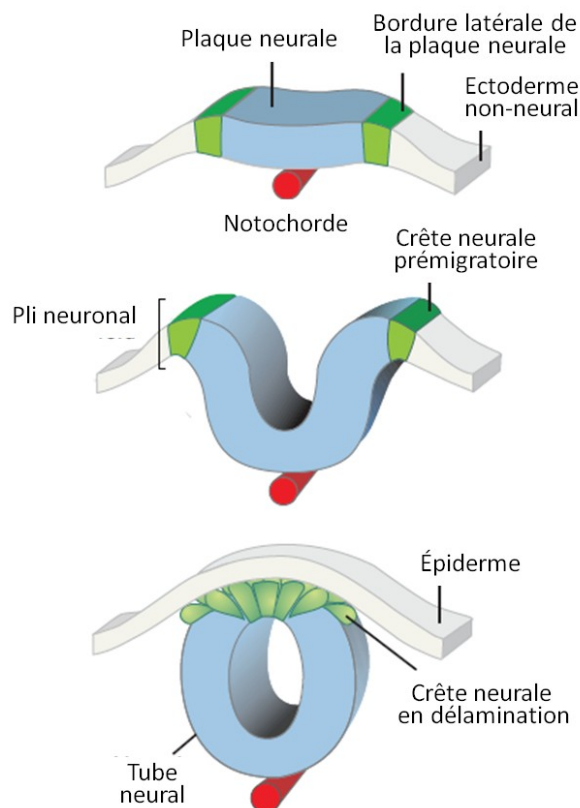


Figure 1.3 La formation du tube neural
Adapté de Simoes-Costa et Bonner, 2015 [11]. ENN: ectoderme non-neural, BLPN: bordure latérale de la plaque neurale, TN: tube neural.

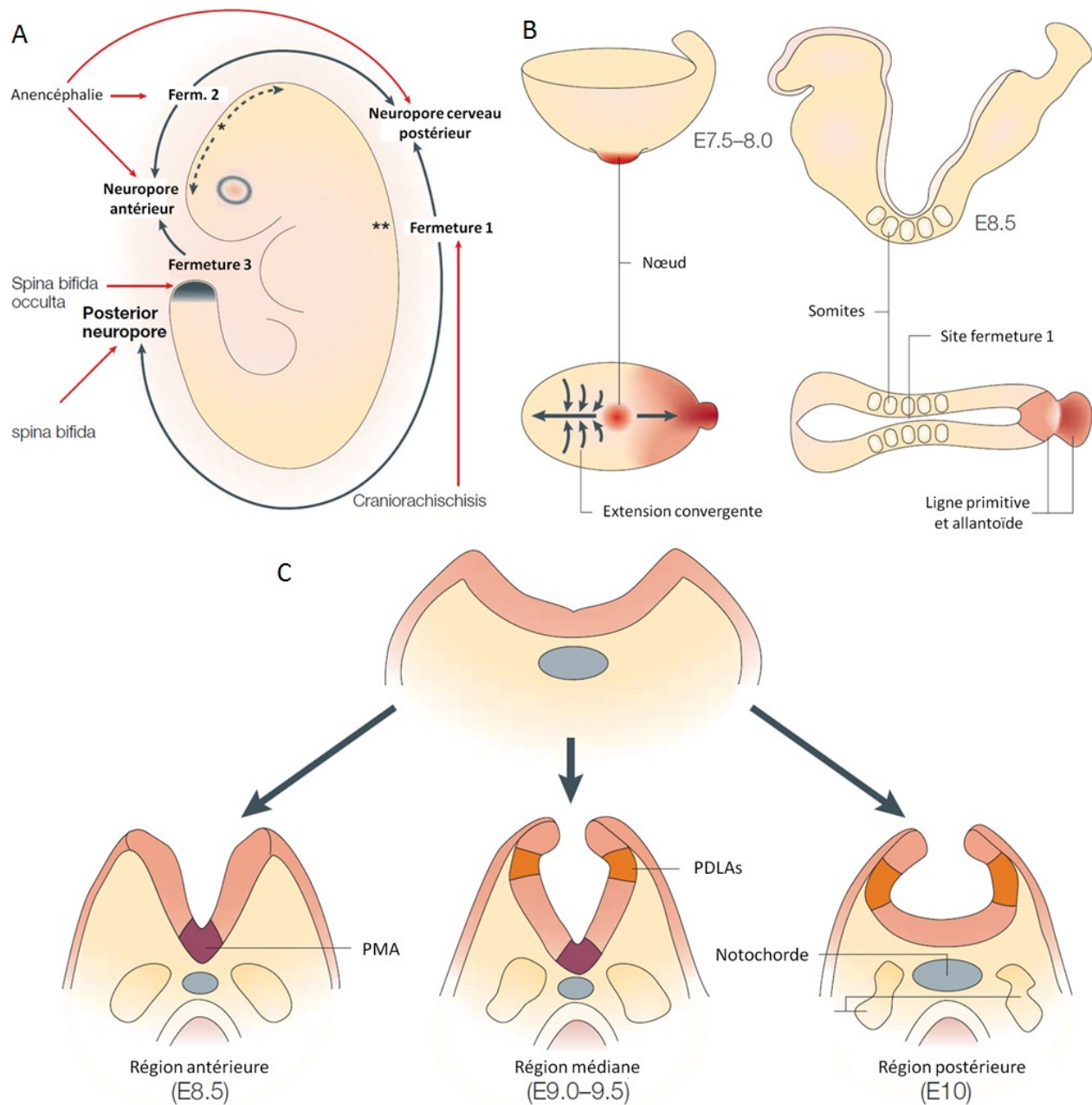


Figure 1.4 Séquence spatio-temporelle de la neurulation dans l'embryon de souris.

Adapté de Copp *et al*, 2003 [9]. A. Séquence rostro-caudale des événements de neurulation qui débutent par la fermeture 1 du NT – la fermeture du NT se fait de manière rostrale et caudale à partir de ce point. L'emplacement de certains DFTNs est indiqué par des flèches rouges. B. Façonnage de la plaque neurale au commencement de la fermeture du NT. C. La morphologie de la neurulation le long de la moelle épinière, vue en coupe transversale.

1.1.2.2. Les défauts de fermeture du tube neural

Les défauts de fermeture du tube neural (DFTN) regroupent les malformations congénitales qui surgissent lorsque le TN ne parvient pas à fermer lors de l'embryogenèse. Ces défauts apparaissent dans une grossesse sur 1000 et sont la deuxième cause de

malformation embryonnaire chez les humains, après les malformations cardiaques congénitales [9]. Ces défauts sont de gravités variables selon qu'ils résultent de défauts dans la neurulation primaire ou la neurulation secondaire; les défauts issus de la neurulation primaire étant plus graves.

Les DFTNs dits « ouvert » comprennent l'exencéphalie, l'anencéphalie, le craniorachischisis et le spina bifida (Figure 1.4a et 1.5). Ces anomalies impliquent une connexion pathologique entre la lumière du TN et l'environnement extérieur. L'exencéphalie a lieu lorsque la fermeture ne se fait pas dans le cerveau en développement; les plis neuraux ouverts ont un aspect évasé et le cerveau fait sailli dans l'environnement extérieur. Puisque la voûte du crâne ne se forme pas, il y a dégénération des tissus neuraux exposés ce qui donne lieu à l'anencéphalie. L'anencéphalie peut aussi être associée à des malformations du visage. Au niveau de la moelle épinière antérieure, le DFTN peut mener au craniorachischisis, dans laquelle la majeure partie du cerveau et toute la moelle épinière sont exposées à l'environnement extérieur. Le défaut le plus commun, qui implique un défaut de fermeture dans le TN postérieur, est le spina bifida, qui lui n'est pas synonyme de mort embryonnaire. Toutefois, les gens atteints souffrent de défauts moteurs et sensoriels dans les jambes, d'incontinence urinaire et fécale, de défauts de la courbature de la colonne vertébrale et d'hydrocéphalie [9, 10, 12, 13] (Figure 1.4a et 1.5).

Les dysraphies spinales, telles que le spina bifida occulta, sont des DFTNs dits « fermés ». Ces anomalies résultent de l'échec de la moelle épinière émergente de se séparer des autres tissus du bourgeon de la queue [9, 12]. Beaucoup moins grave que la forme dite « ouverte », le spina bifida occulta qui résulte d'un défaut « fermé » peut provoquer une faiblesse des membres inférieurs et des incontinenances urinaires chez les jeunes enfants [9, 10, 12, 13] (Figure 1.4a et 1.5).

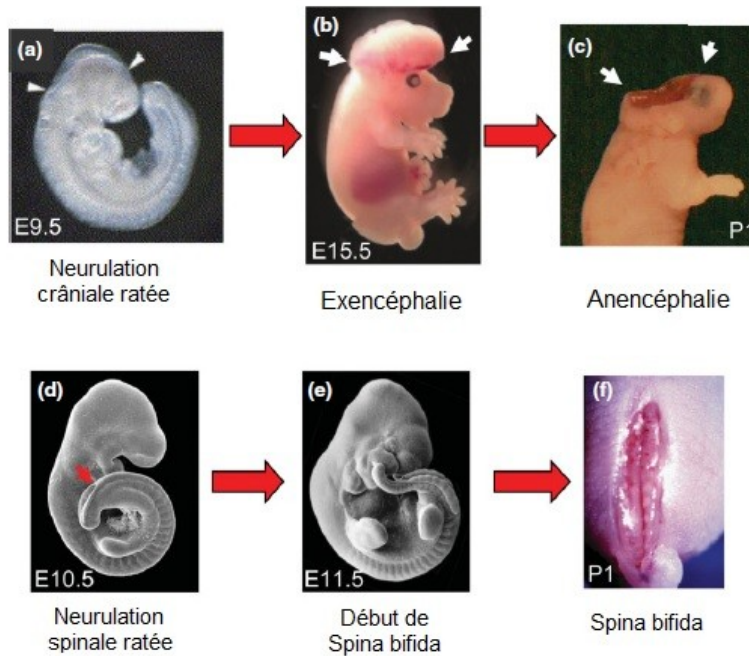


Figure 1.5 Défauts de formation du tube neural.

Adapté de Copp et Greene, 2013 [12]. L'exencéphalie, l'anencéphalie et le spina bifida sont des exemples de défauts de formation du tube neural « ouvert ».

1.1.2.3. *La formation de l'axe antéropostérieure et dorso-ventrale*

La mise en place des axes embryonnaires peut être considérée comme le point de départ pour la structuration embryonnaire et est nécessaire, à partir de la neurulation, pour toutes les étapes subséquentes de l'embryogenèse [7]. Il est important de comprendre que la plaque neurale est organisée et que différentes régions de la plaque neurale ont des caractéristiques différentes. Ainsi, la plaque neurale est organisée selon deux axes principaux : l'axe AP et l'axe DV. Le système nerveux doit se développer en relation avec les autres structures corporelles et donc c'est ainsi qu'il est en partie coordonné par les « organisateurs ».

Ce serait la formation de la LP lors de la gastrulation, à E6,5, qui serait le premier signe morphologique de l'axe AP. La LP marque le côté postérieur de l'embryon et serait critique pour définir non seulement l'axe AP, mais aussi l'axe DV. La définition de ces deux axes mènerait, par défaut, à la définition de l'axe gauche-droit [2]. La formation de la LP est, toutefois, précédée par des asymétries qui établissent la position et la polarité de l'axe AP. Avant que la gastrulation soit entamée, une région distincte de l'EV, l'endoderme viscéral antérieur (EVA), initierait le développement de l'axe AP [14]. L'EV peut être divisé en

plusieurs sous populations cellulaires qui se distinguent les unes des autres par des marqueurs moléculaires spécifiques. Un groupe d'entre elles, situées à l'extrémité distale du cylindre, forment l'endoderme viscéral distal (EVD) à E5,5 (Figure 1.6a). Les signaux de Nodal, ainsi que les signaux de la voie Wnt- β -caténine, induisent une régionalisation proximale-distal (PD) dans l'EPI. Nodal, initialement exprimé dans tout l'EPI, conjointement avec son corécepteur Cripto, activent les récepteurs de type I et II (sérine/thréonine kinase) de la famille TGF- β qui, à leur tour, phosphorylent l'effecteur intracellulaire SMAD2. Les complexes pSMAD2 (SMAD2 phosphorylé) jouent un rôle clé dans la formation de l'EVD. Les signaux Nodal-SMAD2 induisent l'expression de facteurs de transcription FOXA2 et LHX1, ainsi que des antagonistes des voies de signalisation Wnt et Nodal, dont DKK1, CER1 et LEFTY1 [3, 7, 14-16] (Figure 1.6b). La formation de l'EVD à l'extrémité distale de l'embryon initie l'inhibition de la signalisation par Nodal et Wnt dans l'EPI sus-jacent, limite l'activation de gènes cibles à la région la plus proximale et maintient le caractère antérieur aux cellules de l'EPI distal. L'EVD restreint l'activité de Nodal au niveau proximal [14]. La perte fonctionnelle de SMAD2 entraîne une perte des antagonistes de Nodal et donc Nodal serait présent partout dans l'EPI, provoquant une activation ectopique de gènes dits postérieurs, y compris *Wnt3*, *Brachyury* et *Fgf8* [7, 14]. La voie de signalisation Wnt- β -caténine est aussi nécessaire pour le maintien de l'axe PD. La perte d'un régulateur négatif de cette voie entraîne l'activation constitutive de cette dernière dans tout l'EPI. De E5,5 à E5,75, les cellules de l'EVD sont translocalisées de manière latérale afin de rejoindre la frontière entre l'EPI et l'ExE. Des signaux de Nodal, ainsi que des signaux provenant de l'ExE, réguleraient ce déplacement dirigé [3, 4, 17] (Figure 1.6). Les embryons qui n'ont pas le corécepteur Cripto, ne peuvent pas effectuer ce déplacement (EVD \rightarrow EVA), tout comme pour les mutants *Otx2*, une cible des complexes FOXA2 (induits par SMAD2) [7, 15]. Dans ces embryons mutants, le remodelage de l'EPI ne peut s'effectuer de sorte que la région distale adopte un caractère antérieur et la région proximale un caractère postérieur. Les marqueurs de la LP sont alors exprimés de manière ectopique dans les cellules du côté opposé à la LP, où ils ne sont pas marqués normalement [3]. L'action antagoniste de l'EVA sur la signalisation Wnt, via DKK1, telle que mentionné ci-haut, montre qu'elle peut bloquer cette voie de signalisation. Ceci suggère donc que le rôle premier de l'EVA est de restreindre l'activité de signalisation de facteurs tels que Nodal et Wnt au côté postérieur de l'embryon [3]. Lors de la gastrulation, la

LP est formée du côté de l'embryon opposé à l'EVA, identifiant ainsi l'EVA comme un repère fiable du pôle antérieur de l'axe du corps. La localisation asymétrique de l'EV d'un côté de l'embryon délimite donc la polarité et l'orientation de l'axe AP potentiel [17] (Figure 1.6). Ceci permet donc au TN d'être divisé en différentes régions le long de l'axe AP.

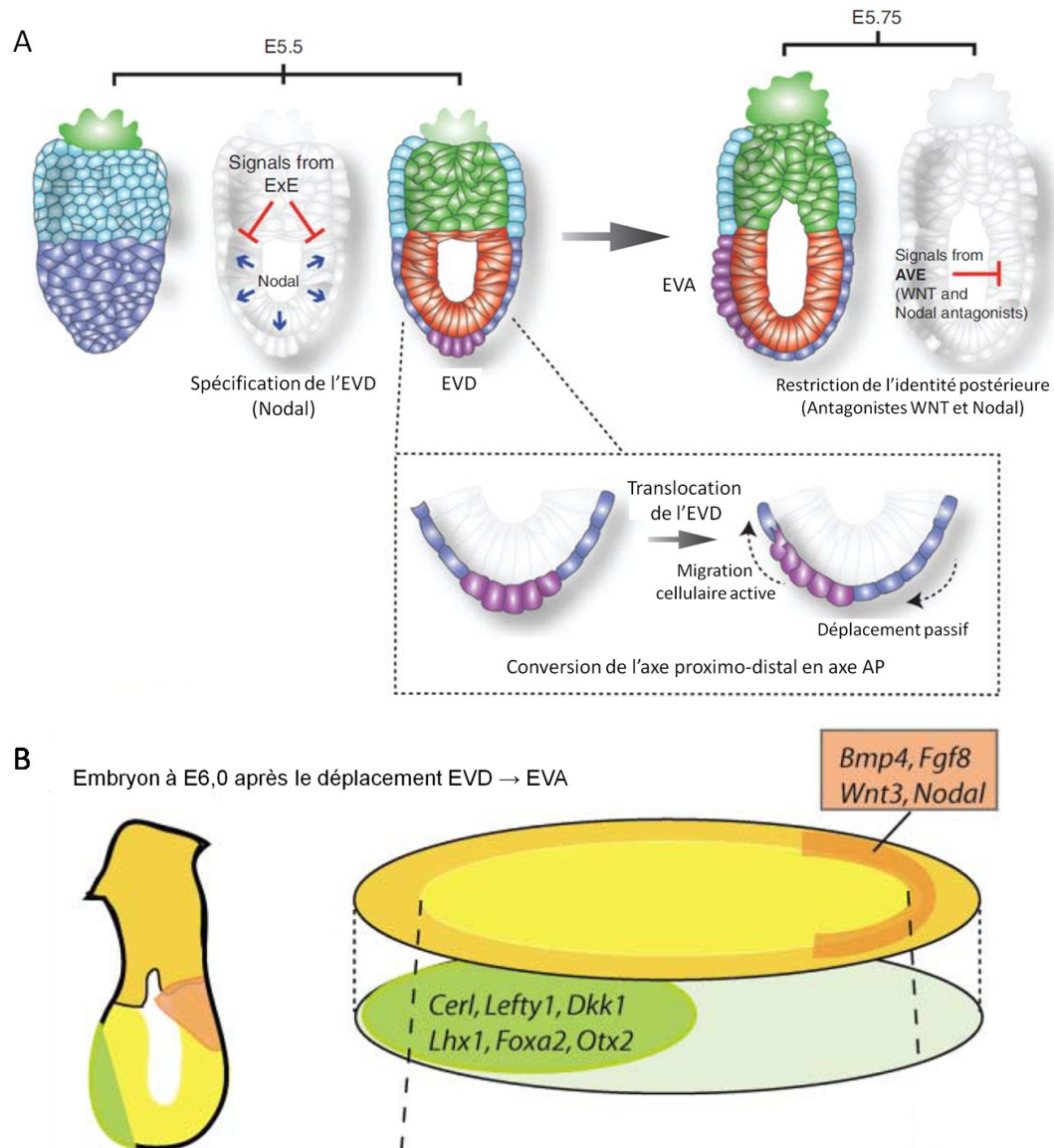


Figure 1.6 Les différentes populations cellulaires dans l'endoderme viscéral.

Adapté de Rivera-Pérez et Hadjantonakis, 2014 [3] et de Rossant et Tam, 2004 [14]. A, Représentation des différentes populations de cellules dont est composé l'EV, telles que défini par la position et la morphologie. A et B, le déplacement de tissus (EVD → EVA) et l'activité de signalisation ayant lieu entre E5,5 et E6,0. B, les signaux exprimés dans l'embryon à E6,0 après le déplacement EVD → EVA.

Contrairement à l'axe AP qui est dicté par l'EVA, l'axe DV est dicté par l'endroit où sera formée la LP [18]. Plusieurs études génétiques démontrent que la voie de signalisation des BMP joue un rôle majeur dans la formation de l'axe DV lors du développement embryonnaire [5, 19-21]. L'axe DV serait spécifié par un gradient de signalisation de BMP, où les niveaux les plus élevés spécifieraient les tissus plus ventraux, tandis que des niveaux intermédiaires spécifieraient des tissus plus latéraux, et la très faible présence, voire l'absence, de BMP spécifierait les tissus dorsaux [20, 22]. Dans le mésoderme, de manière dorsale à ventrale, la plaque préchordale, la notochorde, les somites (qui vont former les muscles squelettiques, la colonne vertébrale et le derme) ainsi que les reins, sont dépendants du gradient de BMP [20, 23]. Des trois feuilletts embryonnaires formés au niveau de la LP pendant la gastrulation, c'est l'ectoderme qui va former la plaque neurale (PN) et éventuellement le système nerveux en entier. Les cellules de l'EPI qui ne migrent pas au mésoderme ou à l'endoderme sous-jacent sont vouées à devenir de l'ectoderme – soit l'épiderme et le tissu neural. La régionalisation DV du TN est particulièrement importante pour la bonne spécification des neurones, des ganglions et une population spéciale de cellules appelées cellules de la crête neurale (CCNs). Il y aurait un modèle neural « par défaut », tel qu'exprimé par Munoz-Sanjuan et Brinvalou (2002), dans lequel la LP sécrèterait des antagonistes de la voie BMP qui spécifierait le tissu neural, ce qui serait la voie automatique, soit l'état de différenciation des cellules épiblastiques par défaut [24, 25]. Plusieurs preuves supportent ce modèle par défaut: la perte d'un récepteur clé de la voie de signalisation BMP, le récepteur BMPRIa, mène à une différenciation neuronale précoce [26]; l'expression soutenue des antagonistes de BMP dans l'ED et dans le mésendoderme pendant la gastrulation permet au neuroectoderme d'être maintenu; les souris mutantes doubles homozygotes pour les antagonistes Chordin et Noggin (*chordin^{-/-} ::noggin^{-/-}*) mènent à des défauts sévères dans le développement du système nerveux central antérieur [19].

1.1.2.4. *Séquence spatio-temporelle de la fermeture du tube neural*

Avant la fermeture du tube neural, à E7,5-8,0, l'embryon s'allonge par extension convergente – les cellules se déplacent vers la ligne médiane, antérieure au nœud (de la LP) – augmentant ainsi la longueur par rapport à sa largeur (l'embryon est ainsi allongé le long de

l'axe AP) (Figure **1.4b**). La voie de signalisation Wnt non canonique, soit la voie de signalisation de la Polarité Planaire Cellulaire (PPC) permet à l'extension convergente d'allonger l'embryon. Si les médiateurs de cette voie sont perturbés, la PN demeure large et la fermeture **1** n'a pas lieu [27]. Ainsi, si la fermeture **1** n'a pas lieu, on observe des défauts embryonnaires, tels que le craniorachischisis, chez les souris qui sont homozygotes pour des mutations dans les gènes de la voie PCP, tel que *Vangl2*, *Celsr1* ou les doubles mutants *Dvl1/2^{-/-}::Fzd3/6^{-/-}* [28].

C'est à E8,5, lorsque la plaque neurale antérieure est bien définie et flanquée de cinq paires de somites, que les plis neuraux à la troisième paire de somites vont s'élever afin d'initier la fermeture du tube neural au site **1** [9, 10] (Figure **1.4b**). L'élévation et le repliement des plis se font à deux sites principaux : un point médian d'articulation (PMA) et à deux points dorso-latéraux d'articulation (PDLAs) (Figure **1.4c**). Cette fermeture se fait différemment le long de l'axe du corps : un PMA dans la partie antérieure (E8,5), un PMA et deux PDLAs dans la partie intermédiaire (E9,0-9,5) et deux PDLAs dans la région postérieure (E10) [9, 10, 13]. Les signaux provenant de l'ectoderme, à l'extrémité dorsale des plis neuraux, régulent ces repliements. La sécrétion de l'antagoniste de BMP, Noggin, dans les plis neuraux dorsaux est suffisante pour induire les PDLAs; les embryons *Noggin^{-/-}* réduisent nettement les PDLAs, tandis qu'une sécrétion locale de Noggin stimule ce repliement [13, 27]. Ces repliements sont aussi régulés par des signaux émanant des tissus dorsaux et ventraux non neuraux. Shh (Sonic hedgehog), provenant de la notochorde, régulerait négativement les PDLAs: la fermeture du TN a toujours lieu dans les souris *Shh^{-/-}* [29], mais la surexpression de Shh, ou la mutation d'un récepteur (PTC1) responsable de maintenir « off » la signalisation par Shh, provoque des défauts de fermeture du TN [30, 31]. L'absence de PDLAs dans la partie supérieure pourrait être due à l'expression élevée de Shh qui réprime l'expression de Noggin; lorsque l'expression de Shh est plus basse, il y a présence de PDLAs. La surexpression de la voie de signalisation Shh inhibe le repliement aux PDLAs, ce qui mène à un spina bifida et une exencéphalie dans les différents mutants [9]. Ceci indique que la régulation de repliement par Shh est un mécanisme qui a lieu à tous les niveaux de l'axe du corps [9]. Les embryons mutant pour *Zic2* (Kumba; *Zic^{Ku}*), pour qui les PDLAs sont absents, développent de graves spina bifida [27] et des défauts de fermeture au niveau du cerveau [32].

Après l'élévation et le repliement des plis neuraux, s'ensuit l'apposition de ces plis neuraux et leur fusion. Le TN naissant est alors recouvert d'un ectoderme de surface [10].

1.2. La crête neurale

1.2.1. *La crête neurale et ses origines*

Le plan de corps des vertébrés a évolué de concert avec d'importants changements dans la morphologie des chordés, soit la formation d'une « nouvelle tête » – assemblage d'un squelette craniofacial, expansion du neuroépithélium en cerveau, réorganisation du pharynx et apparition de nouveaux systèmes sensoriels. L'émergence de cette « nouvelle tête » est liée à l'émergence de deux nouveaux types cellulaires, les cellules de la crête neurale (CCNs) et les cellules placodales de l'ectoderme [33]. Les CCNs sont une population remarquable de cellules qui sont multipotentes et migratoires, ayant la capacité de se différencier en de nombreux dérivés tels que les os et le cartilage de la face, les mélanocytes et les ganglions sensoriels et sympathiques [11, 34, 35]. Ces cellules ont affecté l'évolution des chordés d'une manière sans précédent, ce qui a contribué à rendre les vertébrés uniques. Malgré le fait que des cellules avec des sous-ensembles de caractéristiques des CCNs soient présentes dans les chordés invertébrés, ce sont seulement les vertébrés qui ont une vraie crête neurale (CN) [33]. Hall, dans son article *The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic*, 2000, dira que les vertébrés ont quatre, et non trois, feuillet embryonnaires, et que cette CN constitue ce quatrième feuillet. Pour justifier ceci, Hall s'appuie sur le fait que le mésoderme est considéré comme étant un feuillet embryonnaire en raison de la grande diversité de types cellulaires et tissulaires qui proviennent de ce dernier et que les tissus et structures formés par ce feuillet sont les mêmes dans tout le règne animal. Il va de même pour les CCNs dont les dérivés, qui sont plus nombreux que ceux du mésoderme, forment les mêmes tissus et organes chez tous les vertébrés. Il en conclut donc que si le mésoderme se qualifie comme étant un feuillet embryonnaire, il va de soi qu'on considère le même phénomène pour la CN [36].

La CN prend son origine aux bordures latérales de la PN, soit à la frontière entre cette dernière et l'ENN. Lors de la neurulation, lorsque la plaque neurale commence à se replier et

se fermer, les cellules présumées de la CN occupent les plis neuraux des bordures latérales de la PN. Avec l'avènement de la fermeture du TN, les CCNs se retrouvent dans le domaine dorsal du TN. Les CCNs vont subir une TEM, ce qui entraîne la formation d'une population de cellules migratoires et multipotentes, et ce de manière rostro-caudale le long de l'axe AP [34, 35, 37-39] (Figure 1.7a). Les cellules le long de cet axe AP forment des sous populations de CCNs qui peuvent contribuer à des dérivés cellulaires spécifiques selon leurs emplacements à différents niveaux axiaux, soient des populations de CCNs crânielles, vagues, du tronc ou sacrales. À titre d'exemple, les populations crânielles contribuent à la formation, entre autres, du cartilage et des os de la face, ainsi que des neurones et des cellules gliales du système sensoriel crânien; les populations vagues et sacrales contribuent à la formation du système nerveux entérique et les populations du tronc contribuent à la formation de la racine dorsale et des ganglions sympathiques du SNP. Les CCNs de tous les niveaux axiaux contribuent à la formation des mélanocytes et des cellules gliales périphériques [11, 39].

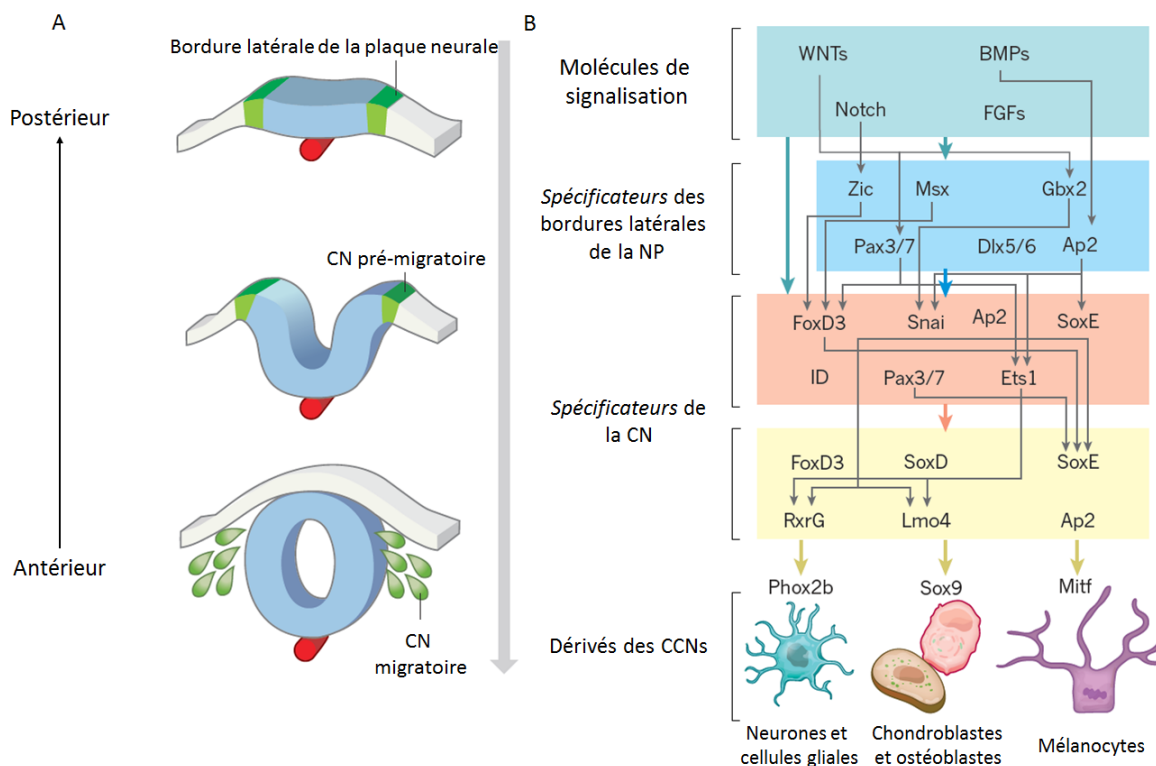


Figure 1.7 Réseau putatif d'interactions et de régulation de gènes contrôlant la formation de la crête neurale chez les vertébrés

Adapté de Green *et al*, 2015 [33]. Une combinaison de signaux provenant de voies de signalisations initie le processus de spécification en induisant des gènes appelés les spécificateurs des bordures latérales de la plaque neurale qui codent pour des facteurs de transcription au niveau des bordures latérales de la plaque. L'action

combinée des molécules des voies de signalisation et ces *spécificateurs* vont induire l'expression d'un second ensemble de facteurs de transcription appelés les spécificateurs de la crête neurale. Ces spécificateurs vont contrôler les étapes suivantes de TEM, délamination, migration et différenciation.

1.2.2. *Le Gene Regulatory Network*

Plusieurs études sur les embryons de grenouille, poisson-zèbre et de poulet ont conduit à la mise en place d'un réseau putatif d'interactions et de régulation de gènes (GRN; Gene Regulatory Network) à travers des facteurs de transcription qui guide la formation de la CN, de ses origines aux bordures latérales, à sa migration et différenciation. Ce réseau, avec certaines variations interspèces, est conservé chez les vertébrés [33, 38, 40]. Plusieurs expériences ont démontré que le GRN de la CN, le CN-GRN, est composé de niveaux hiérarchiques distincts (Figure 1.7b). En premier, une combinaison de signaux provenant de diverses voies de signalisation (Wnt, BMP, FGF (Fibroblast growth factor)) initient le processus de spécification en induisant des gènes appelés les « spécificateurs des bordures latérales de la plaque neurale » (tels que *Pax3/7*, *Zic1/2*, *Msx1/2*) qui code pour des facteurs de transcription au niveau des bordures latérales de la plaque – un vaste territoire avec des cellules qui deviendront compétentes pour former la CN. L'action combinée des molécules des voies de signalisation et ces spécificateurs vont induire l'expression d'un second ensemble de facteurs de transcription appelés les « spécificateurs de la crête neurale » (tels que *Sox9/10*, *FoxD3*) qui vont définir davantage ce territoire. Il est proposé que ces derniers, en induisant l'expression des gènes effecteurs de la CN, contrôlent finalement les étapes suivantes de la CN, soit la TEM, délamination, migration et différenciation des cellules [38, 40, 43]. Chaque niveau du GRN correspond à un état de régulation qui définit non seulement l'identité et le comportement cellulaire à un instant donné, mais entraîne également la transition vers le prochain niveau hiérarchique [33].

Le développement des populations des CCNs varie dans le temps le long de l'axe AP, de sorte que les stades dits plus âgés dans la morphogenèse de la CN ont lieu à des niveaux antérieurs, tandis que les stades dits plus jeunes se retrouvent à des niveaux plus postérieurs. Ainsi, plusieurs stades du développement de la CN peuvent apparaître de façon rostro-caudale sur un même embryon [41].

La plupart des recherches qui ont étudié le CN-GRN se sont concentrées principalement sur la CN crâniales, qui semble être la plus conservée parmi les vertébrés [39]. Cependant, ce ne sont pas toutes les populations des CCNs qui contribuent aux mêmes dérivés de la CN. À titre comparatif, les CCNs crâniales et du tronc contribuent chacune à la formation de ganglions sensoriels et aux cellules de Schwann, mais seulement les CCNs crâniales contribuent au cartilage et à l'os de la face et du crâne [39]. Lorsque les plis neuraux d'origine crâniales sont transplantés dans le tronc, les CCNs issus de ces plis neuraux peuvent donner lieu à des dérivés des CCNs du tronc normaux [42, 43]. Dans le cas contraire, lorsque les plis neuraux du tronc sont transplantés dans la région crâniales, les CCNs du tronc ne parviennent pas à contribuer à des lignées squelettiques *in vivo* [44] et ne donnent lieu à du cartilage que de manière *in vitro*, lorsque des conditions de culture appropriées sont appliquées [45, 46]. La différence entre les CCNs crâniales et du tronc est mise encore plus en évidence à l'aide d'analyses de régulation *in cis*. Les analyses des régions régulatrices de *FoxD3* et *Sox10*, des *spécificateurs* de la CN, ont démontré qu'ils ont différents enhancers qui sont spécifiques à des niveaux axiaux distincts. L'expression des gènes *FOXD3* et *SOX10* dans la CN du crâne ou du tronc des embryons de poulet est contrôlée par ces différents enhancers, mais jamais par les deux. Qui plus est, ces enhancers peuvent être activés par différents signaux [33, 47-52]. Étant donné qu'il existe différentes populations de CCNs le long de l'axe AP qui ont des potentiels différents de développement ou des programmes génétiques distincts, un unique CN-GRN pourrait ne pas suffire pour expliquer la formation de la CN à tous les niveaux le long de cet axe [39]. Par conséquent, il est fortement concevable qu'un autre CN-GRN, plus adapté pour le tronc, existe.

1.3. Les voies de signalisation et le développement du tube neural et de la crête neurale

Tel que mentionné précédemment, c'est l'ectoderme qui va former la plaque neurale et éventuellement le système nerveux en entier, y compris le SNC, le SNP et la CN. Les cellules présentes au niveau de la plaque neurale vont être incorporées dans ces différents systèmes grâce à des signaux provenant d'un groupe restreint de voies de signalisation présentes durant le développement. Le développement de différents types de cellules dépend non seulement de l'expression spatio-temporelle des différentes molécules de signalisation, mais aussi de leurs

récepteurs et inhibiteurs endogènes [53]. De plus, le rôle des différentes molécules de signalisation dépend de sa concentration, du temps d'exposition et de sa combinaison ou non avec d'autres molécules de signalisation. Le développement de la CN se fait le long de l'axe AP et DV, en fonction de leur exposition temporelle à différentes voies de signalisation. Or, la voie de signalisation Wnt est connue pour jouer un rôle postériorisant dans la formation de l'axe AP et la voie de signalisation BMP est connue pour jouer un rôle dans l'axe DV et conséquemment dans le développement du système nerveux. En plus de ces deux voies, d'autres voies de signalisation sont connues comme jouant des rôles dans le développement de la NC, telles que les voies FGF, de l'acide rétinoïque (AR), Notch et Shh [34]. Cette étude s'est toutefois attardée aux voies de signalisation Wnt et BMP, et au rôle que ces signaux ont sur l'induction et le développement de la NC.

1.3.1. *La voie Wnt et la NC*

Les Wnt sont des protéines sécrétées, soit des ligands, qui initient une cascade de signalisations complexes menant, dans la voie canonique, à la stabilisation et l'accumulation dans le noyau de la protéine β -caténine; c'est la voie Wnt- β -caténine (Figure 1.8). Lorsque les ligands Wnt sont absents, par exemple en présence d'inhibiteurs WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) ou sFRP (soluble frizzled-related proteins), ou que les co-récepteurs LRP sont inhibés par DKK1, le complexe de destruction de β -caténine, qui contient entre autres l'APC (Adenomatous polyposis *coli*), la GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) et l'Axine, recrute et phosphoryle la β -caténine. Une fois phosphorylée, la β -caténine est rapidement dégradée par le protéasome, menant à son épuisement dans le noyau. Les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF recrutent alors des corépresseurs, empêchant l'expression des gènes cibles de la voie Wnt- β -caténine [7, 54, 55]. Lorsque les ligands Wnt sont présents, ils se lient aux récepteurs FZD (Frizzled) ce qui permet aux récepteurs LRP d'être phosphorylés par GSK3. Les protéines DVL sont alors recrutées pour empêcher la formation du complexe de destruction de β -caténine. La β -caténine peut alors être transloquée au noyau et s'associer aux facteurs de transcription TCF/LEF afin de réguler l'expression de gènes cibles [7, 54-57] (Figure 1.8). La signalisation par Wnt peut également activer des voies non canoniques, telle que la voie Wnt/ Ca^{2+} ou la voie PCP (Planar cell polarity) [58].

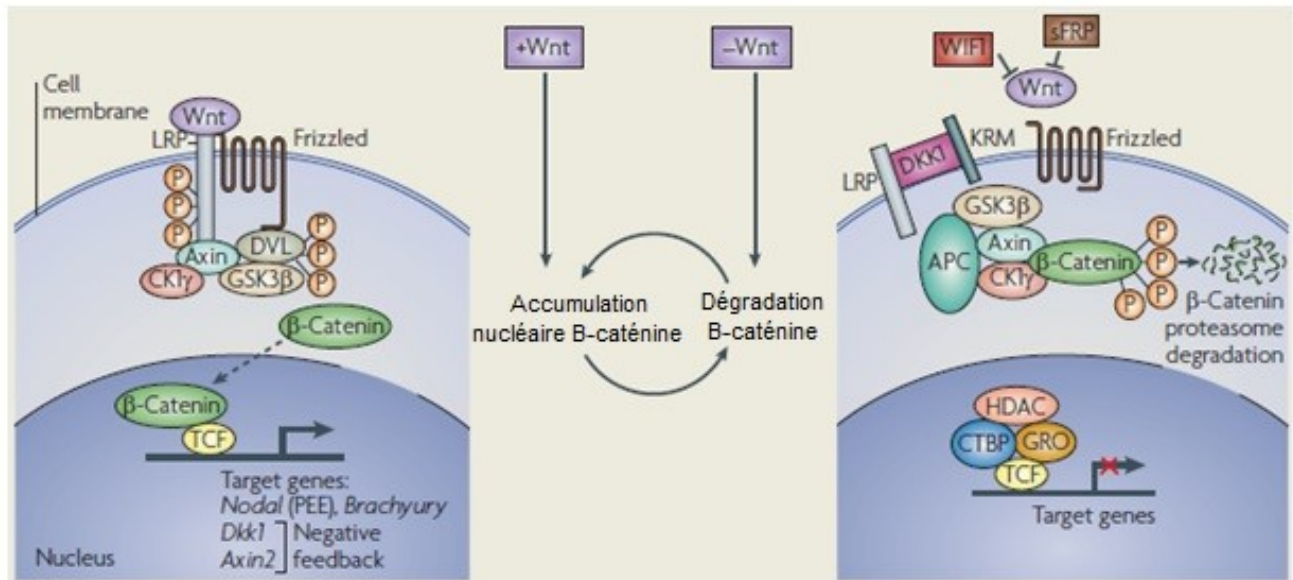


Figure 1.8 La voie de signalisation Wnt- β -caténine

Adapté de Arnold et Robertson, 2009 [7].

La voie de signalisation Wnt est impliquée dans plusieurs processus biologiques au cours du développement. Notamment, cette voie a un rôle postériorisant lors du développement embryonnaire. Tel que mentionné précédemment, les antagonistes de la voie Wnt-canonique, tels que DKK1, sont exprimés au niveau de l'EVA/EVD (extrémité antérieure de l'embryon) pendant la phase de prégastrulation/gastrulation et ces antagonistes permettent de maintenir le caractère rostral (antérieur) de ces cellules. Cette répression de la voie Wnt au niveau rostral est maintenue pendant la gastrulation et s'oppose à une source de ligands Wnt se retrouvant à l'extrémité caudale de l'embryon (à l'extrémité postérieure de la LP). Il en résulte donc un gradient d'activité Wnt (absent au niveau rostral, élevé au niveau caudal) le long de l'axe AP qui joue un rôle postériorisant [7, 14, 53, 59, 60] et qui est même nécessaire pour la formation de cet axe [61-64].

Les études menées chez les embryons de grenouille et de poisson-zèbre démontrent que la voie Wnt canonique est nécessaire pour l'induction de la CN. À titre d'exemple, Wnt8 est exprimé dans la région équivalente aux bordures latérales de la plaque neurale (ZDLM) dans les embryons de grenouille pendant la gastrulation et un knock-down spécifique de Wnt8, que ce soit à l'aide de morpholino ou d'un dominant négatif, inhibe plusieurs spécificateurs des BLPN, tels que *pax3* et *msx1* [65, 66]. Ceci s'est avéré vrai chez les embryons de poisson-

zèbre aussi, où une inhibition de *Wnt8.1* de la voie Wnt canonique a entraîné une perte significative de l'expression de *pax3*, *foxd3* et *sox10* (spécificateurs de la CN) [67]. D'autres études ont confirmé davantage la nécessité de la voie Wnt canonique dans l'induction de la CN chez ces espèces [68, 69]. Les recherches effectuées sur des embryons de grenouille et de poulet dans le laboratoire de Goulding ont démontré que l'expression de *pax3* est induite dans la PNP en réponse à des signaux postériorisant provenant des voies de signalisation Wnt, FGF et AR [68, 70]. Ces études démontrent que l'expression de *pax3* est seulement bloquée par une forme dominante négative de *Wnt8*, et non lorsqu'il y a inhibition des signaux provenant des voies FGF ou AR. C'est donc la signalisation de la voie Wnt canonique qui joue un rôle essentiel dans l'induction de *pax3*, et conséquemment l'induction de la CN [68, 70]. Toutefois, certaines différences spécifiques aux espèces peuvent avoir lieu. À titre indicatif, des expériences effectuées dans les embryons de poisson-zèbre ont démontré que la voie FGF est nécessaire pendant la gastrulation pour induire l'expression de *pax3* au niveau des BLPN [71]. Chez la souris, les facteurs de signalisation de la famille Wnt canonique sont composés de plusieurs membres, dont les gènes *Wnt1* et *Wnt3a*, qui codent pour leurs ligands spécifiques, et sont coexprimés au niveau de la ligne médiane dorsale du TN en développement [72, 73]. Ces signaux sont essentiels pour le développement embryonnaire. Malgré l'importance de Wnt dans l'induction de la CN chez les embryons de grenouille et poisson-zèbre, l'étude des ligands Wnt chez la souris a démontré qu'au niveau du TN dorsal antérieur, les souris mutantes pour ces ligands ne provoquent pas de phénotypes aberrants [34, 72]. Ces études révèlent que les ligands *Wnt1* et *Wnt3a* sont exprimés après la vague d'induction initiale et jouent des rôles dans des étapes subséquentes du développement de la CN. Toutefois, les mutants *Wnt1^{-/-}::Wnt3a^{-/-}* ont une réduction nette de l'expression de certains spécificateurs des NPB, tels que *Pax3* [72]. Malgré l'absence de phénotype au niveau antérieur, les souris mutantes pour certains ligands de la famille Wnt canonique ont des défauts au niveau de la formation de l'axe AP ou au niveau caudal. Les souris mutantes pour *Wnt3* ne parviennent pas à former l'axe AP, et ce avant la gastrulation – il n'y a pas la formation de la LP [61] et les souris mutantes pour *Wnt3a* ont une notochorde perturbée, des défauts dans le mésoderme paraxial et ont un axe AP tronqué, c'est-à-dire qu'il y a perte des somites caudales et du bourgeon de la queue [63, 74]. Comme chez la souris, les ligands Wnt canoniques chez le poulet sont nécessaires au niveau caudal de l'embryon en développement mais doivent être

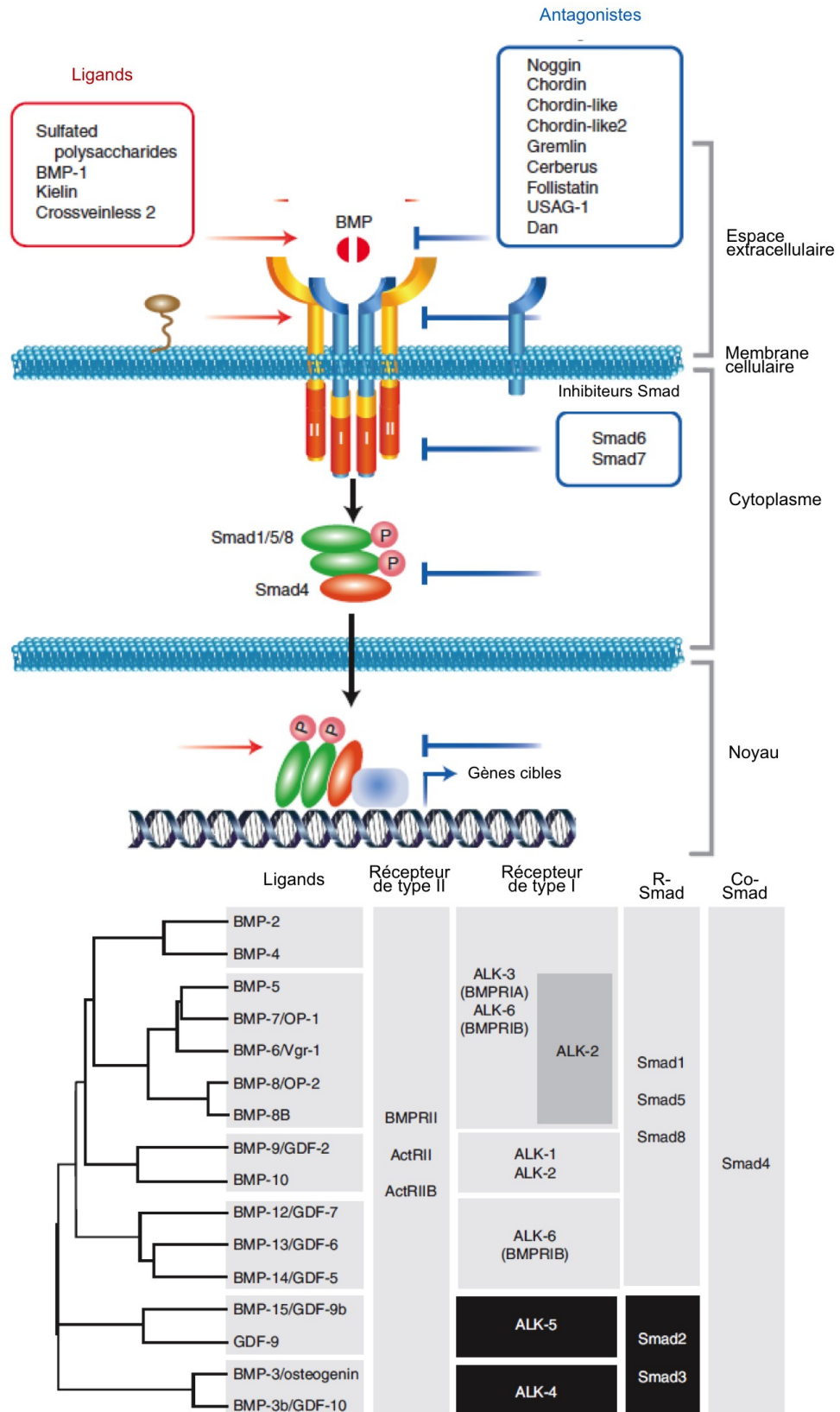
exclus au niveau rostral. Des expériences chez le poulet ont démontré que les ligands Wnt étaient nécessaires pour induire le caractère caudal aux spécificateurs des BLPN et de la CN [53, 60, 75]. D'autres expériences *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'inhibition de Wnt dans les cellules caudales des BLPN empêchait la formation des CCNs [75] et que ces dernières acquéraient un caractère rostral [60]. À l'inverse, l'activation de Wnt dans les cellules rostrales des BLPN, qui ne généraient pas habituellement des CCNs, menait à la production de ces dernières [76]. Conformément aux résultats obtenus chez le poulet, les souris mutantes déficientes en DKK1 voient leurs cellules rostrales des BLPN être transformées en CCNs [77]. Wnt jouerait donc un rôle rostro-caudal dans l'induction de la CN.

1.3.2. La voie BMP et la NC

Les *bone morphogenetic proteins* (BMP) sont un sous-groupe de molécules sécrétées qui appartiennent à la « super-famille » des TGF- β (Transforming growth factor β). La transmission des signaux par les ligands BMP peut se faire par le biais des SMADS ou bien de façon SMAD-indépendante via les voies MAPKs et JNK [78, 79]. Toutefois, nous allons nous concentrer sur la signalisation par la voie SMAD-dépendante, soit la voie BMP canonique. Cette voie est initiée par la liaison de deux ligands BMP à des récepteurs sérine/thréonine kinases, ce qui induit la formation d'un complexe de récepteurs tétramériques. Ce complexe tétramérique est constitué de deux récepteurs de type 1 et deux récepteurs de type 2 (Figure 1.11a). Les récepteurs de type 2 phosphorylent et activent les récepteurs de type 1, qui à leurs tours phosphorylent des sérines à l'extrémité C-terminale des récepteurs-SMAD (R-SMAD1/5/8). Ces phospho-R-SMADs (pSMAD) interagissent avec le co-SMAD (SMAD4) afin de former un complexe hétérotrimère qui est transloqué au noyau afin de moduler l'expression de ses gènes cibles. Ce complexe peut agir seul, ou à l'aide d'autres cofacteurs, pour moduler l'expression de leurs gènes cibles [80] (Figure 1.9a).

Selon leur homologie structurelle, les membres de la famille BMP peuvent être classés en plusieurs sous-groupes, tels que démontré à la Figure 1.9b, comme le groupe de ligands BMP-2/-4 et le groupe BMP-9/-10. La plupart des BMPs sont exprimés dans une variété de tissus pendant l'embryogenèse [79, 81]. Avant la fermeture du TN, plusieurs membres des BMPs sont exprimés dans l'ENN entourant la PN, tel que BMP-2/-4/-5/-7 [80]. Quant aux

récepteurs, il y a trois récepteurs de type II qui sont constitutivement actifs, soit les récepteurs BMPRII, ACTRIIA et ACTRIIB, qui vont phosphoryler les récepteurs de type I (Figure **1.9b**). Des sept récepteurs de type I pour les protéines de la famille des TGF- β , il y en a quatre principaux qui servent pour la majorité des BMPs, soit les récepteurs BMPRIA/ALK-3, BMPRII/ALK-6, ALK-2 et ALK-1. À titre d'exemple, les BMP-2 et BMP-4 se lient à ALK-3 et -6, alors que les BMP-6 et BMP-7 se lient faiblement à ALK-6 et fortement à ALK-2 (Figure **1.9b**). Il existe 8 protéines SMAD (1 à 8) identifiées chez les mammifères et, dans la voie BMP, ce sont les R-SMADs 1/5/8 qui sont phosphorylés; ce sont des facteurs de transcription homologues à ceux chez la drosophile (MAD; mother's against decapentaplegic) (Figure **1.9b**). Les SMAD2/3 sont les SMADs propres à la voie TGF- β et ne sont pas activés par les ligands BMP. SMAD4 est le seul co-SMAD chez les mammifères, partagé à la fois par la voie BMP et la voie TGF- β . Il existe une troisième classe de SMADs, les SMADs inhibiteurs (I-SMAD), qui régulent négativement la signalisation par les R-SMADs; ce sont les SMAD6/7 qui agissent comme I-SMAD [78, 80]. Au niveau extracellulaire, la signalisation par les BMPs est régulée par des antagonistes de cette voie, qui fonctionnent en se liant directement aux BMPs, empêchant ces derniers de se lier à leurs récepteurs spécifiques. Noggin, Chordin, Follistatin et Cerberus sont des exemples de ces antagonistes [79] (Figure **1.9a**).



Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'axe DV serait spécifié par un gradient de signalisation de BMP [20, 22]. Ceci se conjuguerait à un modèle neural « par défaut » dans lequel la LP sécrèterait des antagonistes de la voie BMP qui spécifieraient le tissu neural [24, 25]. La voie BMP joue donc un rôle important dans le développement embryonnaire et dans la formation du TN. Ceci est mis de l'avant par des souris knockouts (KO) pour des ligands et/ou récepteurs de la voie BMP : les souris KO pour le ligand BMP4, le récepteur de type II, BMPRII, et les récepteurs de type I, *Alk2* et *Alk3*, ont une létalité embryonnaire et les embryons meurent juste avant ou après la gastrulation [21, 82-85]. Quant à leur implication dans la formation du TN, et donc dans la formation du SNC, les études sont multiples pour démontrer la nécessité de la voie BMP. Puisque les souris KO pour *Alk3* (BMPRIa) ne sont pas viables, une étude utilisant un allèle conditionnel de *Bmpr1a* pour supprimer BMPRIa seulement dans l'épiblaste a été réalisée. Cette étude a démontré que la perte du récepteur BMPRIa dans l'épiblaste résulte en de graves problèmes lors de la morphogénèse : l'ectoderme neural antérieur est considérablement agrandi et alambiqué, plus particulièrement au niveau du prosencéphale (cerveau antérieur), au détriment de l'ectoderme de surface et dans le tronc, la neurulation échoue à tous les niveaux axiaux [26]. D'autres études ont démontré les DFTNs qui peuvent avoir lieu lorsqu'il y a inhibition ou surexpression (à travers la perte des antagonistes) des BMPs. Les souris mutantes pour l'antagoniste Noggin (*Noggin*^{-/-}) subissent une létalité embryonnaire due à un défaut dans la fermeture du TN [86-88]. Les souris mutantes doubles homozygotes pour les antagonistes de la voie BMP Chordin et Noggin (*Chordin*^{-/-} : *Noggin*^{-/-}) mènent à des défauts sévères dans le développement du système nerveux central antérieur [19]. À E12,5, les embryons double mutants ont des phénotypes sévères de DFTN, ressemblant à l'aprosencéphalie: les embryons avaient une absence presque totale du prosencéphale et manquaient aussi les yeux, les placodes nasales et des structures du visage [19]. La fermeture du TN, telle que mentionnée précédemment, se fait par l'élévation et le repliement des plis neuraux à deux sites principaux : un PMA et à deux PDLAs. Une étude effectuée sur les embryons de souris *Bmp2-nulles* (*Bmp2*^{-/-}) démontre que ces embryons ont des PDLAs de manière prématurée et ces derniers sont exagérés. La libération locale de BMP-2 aurait pour effet d'inhiber le repliement des plis neuraux, tandis que la libération locale de Noggin stimule ce repliement. Cette même étude a démontré que dans les embryons mutants *Kumba*, où il y a perte de fonction du gène *Zic2* (*Zic2*^{Ku/Ku}), il y

avait perte de formation des PDLAs résultant d'un niveau anormalement élevé de signalisation par BMP, conséquence de la perte de l'expression des antagonistes Noggin et Neuralin. Ceci résulte en un spina bifida sévère dans ces embryons [27]. Des résultats similaires sont observés dans les embryons de poulet, où l'expression d'un dominant négatif d'*Alk3* provoque la formation ectopique de points d'articulations et exagère le repliement du TN [89]. Une autre étude, chez les ligands BMP5 et BMP7 cette fois, a démontré que les souris doubles mutantes *Bmp5^{-/-}::Bmp7^{-/-}* souffrent d'exencéphalie [90].

Les multiples études effectuées sur la voie de signalisation BMP ont permis de démontrer que cette voie jouait un rôle bien établi dans le développement embryonnaire et dans la formation du TN. Et donc, puisque la CN se forme à l'interface entre les tissus médiaux et latéraux au niveau de la plaque neurale, la voie BMP a été fortement suggérée comme jouant un rôle dans l'induction de la CN. Toutefois, le rôle que joue cette dernière dans la formation de la CN est toujours sujet à discussion. Puisque, au niveau de la plaque neurale, il y a une expression latérale des ligands BMPs et une expression médiale des antagonistes de la voie BMP, il a été proposé qu'un niveau intermédiaire de BMP est nécessaire pour l'induction de la CN. Ce modèle est supporté par des expériences menées dans des explants d'ectoderme d'embryons de grenouille et de poisson-zèbre. Les études effectuées sur les embryons de grenouille ont démontré qu'en augmentant les niveaux de Noggin, donc en établissant un gradient de concentration, on pouvait induire, à différentes concentrations de BMP, des cellules de l'épiderme, des CCNs et des cellules neurales [91, 92]. Ce gradient a aussi été démontré chez les embryons de poisson-zèbre [92, 93] et c'est grâce aux études de poisson-zèbre que des preuves génétiques pour un rôle de la signalisation par BMP dans l'induction des CCNs ont été démontrées. Divers mutants affectant la voie de signalisation BMP/SMAD subissent une réduction ou une perte des marqueurs des CCNs, comme *Msx1* et *FoxD3* [92], voire même une perte de la spécification des cellules progénitrices de la CN lorsque la signalisation par BMP est éliminée [92, 94]. D'autres études effectuées sur les embryons de poisson-zèbre ont démontré que des niveaux intermédiaires de signalisation par la voie BMP positionnent le domaine d'expression de *pax3* aux BLPN dans le PNP, car la surexpression du ligand *bmp2b* mène au déplacement médial du domaine d'expression de *pax3* dans la région du tronc [71]. Toutefois, la manière dont ce gradient est mis en place n'est pas encore comprise car, bien que l'expression des antagonistes Noggin, Chordin ou

Follistatin de la voie BMP soient nécessaires afin d'établir ce gradient de concentration, dans les embryons de poisson-zèbre, un knockdown (par morpholino) de ces trois antagonistes révèle que la CN peut encore être induite [95]. Ainsi, il se pourrait que l'activité des BMP puisse être modulée à des niveaux nécessaires pour permettre l'induction de la CN par d'autres mécanismes que ces seulement ces antagonistes. Chez le poulet, la notion de gradient est aussi mis de l'avant, car des études ont suggéré que les tissus du futur cerveau antérieur qui sont exposés à différents niveaux de signalisation par BMP peuvent induire différents types cellulaires [53, 96], tout comme il a été mis de l'avant que l'activation des BMP-4/-7 était nécessaire pour l'induction des CCNs [97]. L'étude de souris double mutantes pour les antagonistes Noggin et Chordin, *Chordin*^{-/-} : *Noggin*^{-/-}, a démontré que ces souris ont une expansion de l'expression des marqueurs de la CN, tels que *Msx2* et *Sox10*, et que ces cellules subissent une délamination précoce. De plus, ces souris développent des défauts dans des systèmes dérivés des NCCs, soit dans le SNP et dans le squelette craniofacial [98]. Cette étude démontre, par colocalisation, que ces antagonistes ne suppriment pas complètement la signalisation par BMP dans la CN et le TN dorsal. Au contraire, ils aideraient à garantir des niveaux appropriés d'activité BMP et définissent les limites spatio-temporelles au sein de la plaque neurale [98]. Ces différentes études supportent alors la théorie où la signalisation par BMP, à des niveaux intermédiaires, est nécessaire pour l'induction de la CN.

De nouvelles expériences ont toutefois questionné ce gradient de concentration de BMP et une explication alternative au modèle de gradient a été mise de l'avant. Il s'agirait d'un modèle en deux temps, dans laquelle une inhibition initiale de la signalisation par BMP serait nécessaire pour permettre l'induction de la CN, suivi d'une activation de la signalisation par BMP pour permettre de maintenir la CN. Ce modèle a été mis de l'avant par une étude effectuée sur des explants d'embryons de grenouille: l'induction de la CN pendant la gastrulation serait permis par des signaux Wnt et FGF, ainsi que par une inhibition complète de la signalisation par BMP. Toutefois, l'activation subséquente de la signalisation par BMP est nécessaire pendant la neurulation afin de permettre le maintien des populations de CCNs car lorsqu'on traite, pendant la neurulation, ces explants avec Noggin, ceci résulte en une inhibition de marqueurs spécifiques de la CN [34, 66]. Une autre étude utilisant une lignée de souris qui supprime conditionnellement *Bmpr1a* dans la future CN à l'aide de *Pax3-Cre* remet en question ce gradient de BMP et le besoin initial de BMP pour l'induction de la CN. Cette

étude démontre que, malgré la perte de *BMPR1a*, les marqueurs précoces de la NC sont toujours induits dans la région crâniale. Toutefois, dans la région postérieure du tronc, il y avait une diminution dramatique des marqueurs précoces de la CN et des CCNs, et ainsi, le développement est retardé ou compromis [99]. Cette différence régionale de la CN et des CCNs refléterait-elle une exigence différente pour la signalisation par BMP dans la région crâniale et du tronc, ou bien serait-elle seulement le résultat de l'expression plus robuste de *Pax3-Cre* dans la région du tronc par rapport à celle observée antérieurement? Comment expliquer les incohérences mises de l'avant par ces différentes études quant à la nécessité ou l'absence de niveaux intermédiaires de BMP dans la phase initiale d'induction de la NC chez ces différentes espèces? Les études menées dans le laboratoire de la Dre Gunhaga proposeraient un nouveau modèle pour le rôle de la voie BMP dans l'induction de la CN et consolideraient ces deux modèles. Leur étude, effectuée dans les embryons de poulet, démontrerait que le contrôle temporel de l'exposition à BMP, qui serait régulé par Wnt, spécifierait les bordures latérales de la plaque neurale [75]. L'induction comme telle de la CN serait induite par une phase précoce d'inhibition des BMP suivi d'une phase tardive d'activation des BMP. Leurs expériences ont démontré que de traiter des explants de future CN avec Wnt3a et Noggin génèrent des cellules neurales (*Sox1*⁺, *Sox2*⁺) de caractère caudal, ce qui concorde avec l'activité postériorisante des signaux Wnt. Toutefois, l'expression de Wnt conjuguée à une inhibition de BMP ne permettait pas de générer des cellules des BLPN. Leurs études ont démontré que l'induction des cellules des BLPN requiert en premier lieu des signaux Wnt, qui induisent le caractère caudal à ces cellules, suivi d'une signalisation par BMP qui spécifie les cellules des BLPN. La séquence temporelle de la signalisation est importante, car l'exposition simultanée de ces cellules à des signaux Wnt et BMP induisent la génération de cellules à caractère épidermique [75, 76]. Ainsi, ce serait l'induction de la CN elle-même qui se ferait en deux temps à l'aide de ces deux voies de signalisation; BMP serait nécessaire à cette induction et non pas uniquement au maintien des CCNs. Wnt régulerait le contrôle temporel de l'exposition à BMP qui lui, à son tour, permettrait de spécifier les BLPN. Qui plus est, ce nouveau modèle pour le rôle de la voie BMP dans l'induction de la crête neurale n'exclut pas la possibilité que ce soit un niveau intermédiaire de BMP qui serait nécessaire pour cette induction.

En résumé, la multitude des molécules de signalisation impliquée dans l'induction de la CN a mis de l'avant l'idée que l'induction de la CN est un processus qui se fait en plusieurs étapes, avec différents signaux qui agissent à différents moments, à différentes concentrations et en combinaison ou non les uns avec les autres, pendant le processus inductif. Cette induction se ferait potentiellement grâce au troisième modèle, où l'induction de la CN aux bordures latérales de la plaque neurale requerrait initialement des signaux Wnt, afin d'induire le caractère caudal à ces cellules, suivi d'une exposition à BMP, régulée par Wnt, pour spécifier les cellules des BLPN. Ces deux voies de signalisation seraient étroitement liées, tel que démontré ci-haut.

Tel qu'expliqué par le modèle CN-GRN, ces signaux (Wnt et BMP) initient le processus de spécification de la CN en induisant des gènes spécificateurs, qui codent pour des facteurs de transcription au niveau des BLPN. *Pax3*, l'un de ces spécificateurs, est essentiel pour la formation du TN et des CCNs [100]. Il est donc important de savoir comment ces spécificateurs intègrent les signaux (Wnt et BMP), car la façon dont ces signaux sont intégrés au niveau transcriptionnel n'est toujours pas bien comprise [47, 101].

1.4. PAX3 : le spécificateur des bordures latérales de la plaque neurale

Les gènes *Pax* chez les vertébrés ont été identifiés d'après l'homologie qu'ils portaient au gène *paired* chez *Drosophila melanogaster*. Ces gènes codent pour des protéines ayant deux domaines de liaisons à l'ADN. Il y a 9 facteurs de transcription Pax chez les vertébrés, PAX1 à PAX9, et leurs fonctions sont largement conservées au long de l'évolution des vertébrés, notamment lors du développement, au niveau du CNS et de la CN [102]. Des études ont démontré un rôle prééminent pour PAX3 dans l'induction de la CN, ainsi que pour PAX7 (Figure 1.10). De plus, il a été démontré que plusieurs protéines PAX, comme la 1, 3, 7 et 9, jouaient des rôles dans le développement de multiples structures dérivées de la CN, soit dans la régulation de la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire des cellules cardiaques, sensorielles, pigmentaires et de la crête neurale entérique, par exemple [102]. Les 9 protéines PAX peuvent être regroupées davantage en quatre sous-familles, selon la présence,

ou non, de domaines conservés additionnels. Pendant l'évolution des vertébrés, les paralogues *Pax3* et *Pax7* ont émergé par duplication d'un même gène ancestral *Pax3/7* [103]. La sous-famille III est celle qui regroupe les protéines PAX3 et PAX7 et possède, en plus des deux domaines de liaison à l'ADN, un troisième domaine hautement conservé composé de huit acides aminés, appelé octapeptide [104, 105]. Durant le développement embryonnaire, les membres de cette sous-famille sont fortement exprimés dans le TN dorsal. L'étude des mutations spontanées de *Pax3* chez la souris et l'humain, mutations qui causent des défauts au niveau du TN et de la CN, a permis de faciliter la compréhension de l'importance fonctionnelle de *Pax3* dans le développement du TN et de la CN [106]. Comme il n'y a pas de mutation spontanée pour le gène *Pax7*, des souris *Pax7-nulle* ont été générées par recombinaison homologue [107]. L'étude de la souris *Pax7-nulle* a révélé que toutes les souris mutantes pour ce gène avaient des structures squelettiques du visage qui étaient affectées, ce qui pourrait être lié à un défaut au niveau des CCNs crânielles [107]. Ainsi, *Pax7* jouerait un rôle au niveau antérieur tandis que *Pax3* jouerait un rôle plutôt au niveau postérieur. C'est donc grâce à ce rôle au niveau postérieur que nous allons porter notre attention plus particulièrement sur le gène *Pax3*.

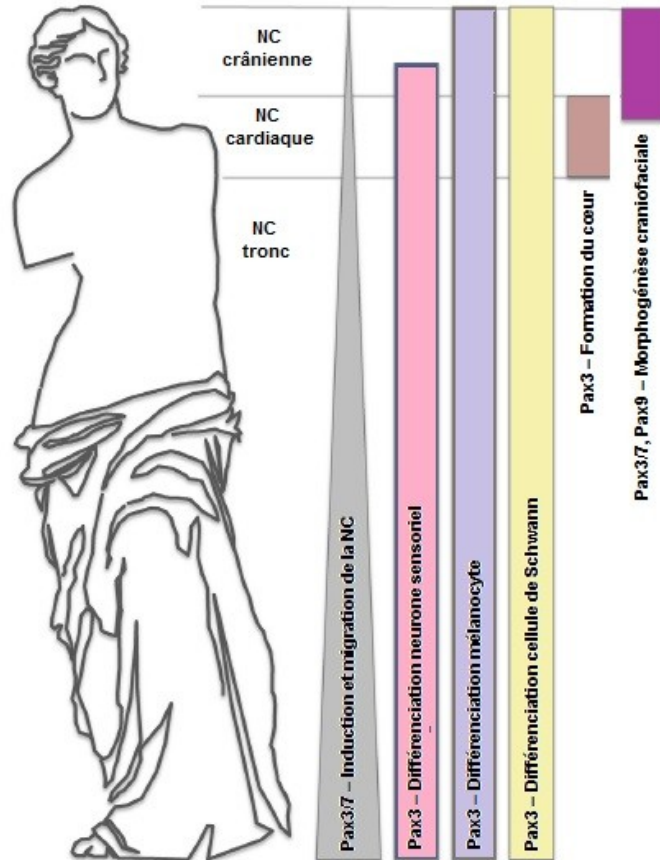


Figure 1.10 Le gène *Pax3* dans le développement de la NC à différents niveaux axiaux.

Adapté Monsoro-Burq, 2015 [102]. Selon les observations faites dans les embryons de souris, le rôle de *Pax3* dans l'induction de la NC est plus important dans la région postérieure.

1.4.1. L'expression de *Pax3*

Les transcrits de *Pax3* sont détectés uniquement au cours de l'embryogenèse, conformes à un rôle dans la structuration de l'embryon. L'analyse des tissus adultes pour les transcrits de *Pax3* démontre qu'aucun tissu, y compris dans le cerveau et la moelle épinière, ne contient des niveaux détectables de l'ARNm de *Pax3* [105]. L'analyse de la distribution spatiale de *Pax3* entre E7 et E14 a révélé que l'expression de *Pax3* débute vers E8,5 dans le TN au début de la neurogenèse. À E8,5, *Pax3* est exprimé au niveau des BLPN, du prosencéphale jusqu'à la marge antérieure de la PNP. Ce patron d'expression de *Pax3* est aussi observé dans d'autres espèces de vertébrés (grenouille et poisson-zèbre) [65] (Figure 1.11). Toutefois, des différences entre espèces peuvent exister, tel que c'est le cas chez les

embryons de poulet. Dans ces embryons, *PAX3* est présent initialement dans toute la PNP et par la suite il devient restreint progressivement au niveau du TN dorsal fermé [108]. Pendant qu'a lieu la neurulation, les BLPN expriment des niveaux croissants de *Pax3* et à la fin de la neurulation, *Pax3* est exprimé dans la moitié dorsale du TN fermé [105]. Les CCNs sont présentes là où est exprimé *Pax3* dans le TN dorsal et *Pax3* est aussi exprimé dans les CCNs migratoires, ainsi que dans les somites le long de la voie de migration des CCNs [109]. Entre E10 et E12, *Pax3* est détecté dans les CCNs du SNP en développement, tel que dans les CCNs migratoires qui contribuent au ganglion spinal, dans le mésenchyme craniofacial dérivé de la CN, dans les CCNs migratoires cardiaques, ainsi que dans le mésenchyme des bourgeons des membres de l'embryon de souris [105]. Au fur et à mesure que les CCNs migratoires se différencient, l'expression de *Pax3* s'éteint, mais elle est maintenue dans la lignée des mélanocytes. Le patron d'expression de *Pax3* dans le système nerveux en développement suggère que *Pax3* joue un rôle important dans la régionalisation du système nerveux des vertébrés, ce qui est en accord avec le fait que *Pax3* est une cible de la signalisation AP et DV. Ce rôle dans la régionalisation du système nerveux a été mis de l'avant avec l'étude de souris transgéniques surexprimant *Pax3* dans l'ensemble du TN. Dans deux lignées de souris transgéniques distinctes, les embryons avaient des développements anormaux des membres, des yeux, du cerveau et du TN, ainsi qu'une altération de la structuration DV du TN spinal [110, 111].

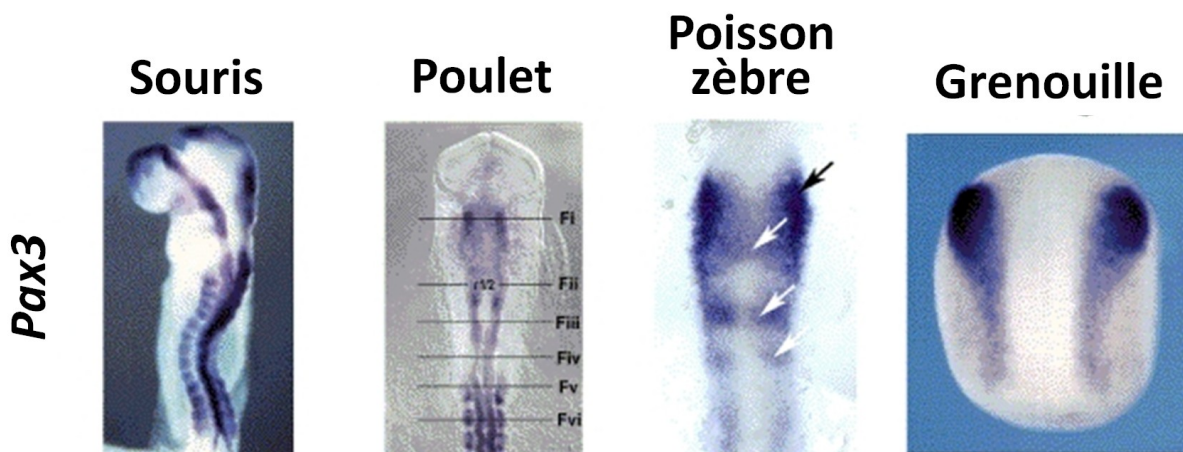


Figure 1.11 Patron d'expression de *Pax3* dans les embryons en développement
 Adapté Nelms et Labosky, 2010 [106]. Exemple du patron d'expression du gène *Pax3* lors du développement embryonnaire chez différentes espèces (la région postérieure des embryons de souris, de poulet et de poisson-zèbre est omise).

1.4.2. *Pax3* et ses maladies

Le lien entre le gène *Pax3* et le développement de la CN a été mis de l'avant par l'analyse des souris mutantes *Splotch*, décrites pour la première fois par Russel (1947)[112] et Auerbach (1954) [113]. Les défauts dans les souris *Splotch* résultent de mutations dans le gène *Pax3*. Les souris hétérozygotes pour la mutation dans *Pax3* ont un phénotype de développement des mélanocytes, avec une tache blanche sur le ventre, sur les pieds et la queue, et le nom *Splotch* vient de cette tache blanche caractéristique [100]. En plus de la mutation spontanée qui a mené à la souris *Splotch* (*Sp*), d'autres mutations dans le gène de *Pax3* de la souris ont été rapportées; les mutations dans le gène *Pax3* peuvent être le résultat i) de mutations spontanées, tel que pour les souris *Sp^d*, ii) de mutations induites par des radiations (mutations, délétions, suppression du gène : *Sp^r*, *Sp^{1H}*, *Sp^{2H}* [114], *Sp^{4H}*) ou iii) des mutations ciblées génétiquement (*Splotch^{2G}*, *Pax3^{Cre}*, *Pax3^{neo}* [115-118]. Les souris *Splotch* homozygotes ont une létalité embryonnaire élevée et meurent autour d'E14. Ces différentes souris *Splotch* ont de multiples phénotypes, ce qui révèle le rôle pléiotropique de *Pax3* dans le développement embryonnaire. Les défauts au niveau du TN sont caractérisés par un spina bifida et/ou une exencéphalie, tandis que les défauts au niveau de la CN incluent des ganglions spinaux et entériques absents ou anormaux, des défauts dans la voie efférente cardiaque, des défauts dans la pigmentation dus à une absence de mélanocytes, un thymus et des glandes thyroïdes et parathyroïdes anormales, ainsi que des défauts dans le développement musculaire [112-114, 118, 119]. En plus des souris qui ont été étudiées pour la perte de fonction du gène *Pax3*, des souris transgéniques qui maintiennent la fonction du gène *Pax3* ont été étudiées. Lorsque *Pax3* est maintenu de façon persistante dans les dérivés des CCNs au cours du développement embryonnaire, ces souris présentent des fentes palatines, des défauts oculaires et des malformations de l'os sphénoïde, en plus de subir une létalité périnatale, probablement due à une incapacité à se nourrir [120].

Les mutations de *Splotch* se retrouvent au niveau gène *Pax3* de la souris sur le chromosome 1. Chez la souris, la séquence d'ADNc de *Pax3* comprend un cadre de lecture ouvert de 1437pb qui code pour une protéine de 479 acides aminés de 56kDa [105]. Chez l'humain, le gène *Pax3* contient 8 exons et la séquence codante pour la protéine PAX3 est

hautement conservée, étant identique à 98% à son orthologue chez la souris [121]. La base moléculaire des mutations *Sp^{2H}* a été révélée en premier par Epstein *et al*, 1991. L'étude a fourni des preuves d'un lien entre la mutation *Sp^{2H}* et la délétion de 32 nucléotides dans le gène et l'ARNm de *Pax3*, qui affectait la liaison de PAX3 à l'ADN [114]. Des analyses subséquentes des mutations des allèles *Splotch* ont démontré qu'elles produisaient quatre transcrits d'ARNm incorrects, dont un qui saute l'exon 4 et trois qui donnent lieu à des déphasages et à la fin prématurée de la traduction, rendant non fonctionnelle la protéine PAX3 [122]. Malgré le fait que le spina bifida soit 100% pénétrant dans les mutants *Splotch* homozygotes, le rôle de *Pax3* dans la régulation de la fermeture du TN n'est pas encore bien compris.

L'analyse de la migration des CCNs dans les souris *Splotch* a été faite à l'aide du rapporteur *Wnt-1:LacZ* pour marquer ces cellules [109]. La coloration des embryons pour l'activité de la β -galactosidase à différents stades dans le développement embryonnaire a révélé que les souris *Pax3^{Sp}* ne parviennent pas à complètement coloniser les tissus cibles en raison d'une perte complète des CCNs qui émigrent du TN caudal. En revanche, il n'y avait aucun retard dans la migration des CCNs à des niveaux crâniens. La perte de la fonction de *Pax3*, tel qu'observé dans les souris *Splotch*, mène à une réduction du nombre de CCNs pré-migratoires résultant en une plus grande réduction du nombre de CCNs au fur et à mesure qu'on se déplace le long de l'axe AP. Plusieurs hypothèses ont été soulevées concernant les mécanismes par lesquels *Pax3* contrôle le développement de la CN, à savoir si les cellules qui causent le phénotype au niveau de la CN dans les mutants pour *Pax3* sont autonomes ou pas. Dans un premier temps, il a été proposé que les défauts dans le développement de la CN dans les souris *Splotch* n'étaient pas intrinsèques. Dans une étude [109], la greffe de tissu neural dans les embryons de souris indique que les défauts chez les mutants *Splotch* ne sont pas intrinsèques aux CCNs elles-mêmes, mais semblent provenir d'interactions cellulaires inappropriées, soit dans le TN, ou entre le TN et les somites – les somites étant connues pour moduler le comportement des CCNs migratoires. Cependant, cette hypothèse a été réfutée par une étude [100] utilisant des souris transgéniques pour le promoteur proximal de 1,6 Kb de *Pax3* qui reproduit l'expression de *Pax3* endogène dans le TN et la CN, mais pas dans les somites. L'introduction de ce transgène dans un fond *Splotch* a permis de démontrer que les défauts causés par les souris *Splotch* au niveau du TN et de la CN pouvaient être corrigés à

l'aide de ce promoteur spécifique. Ceci démontre que le fonctionnement et la migration normale des CCNs peuvent avoir lieu à proximité des somites déficients en *Pax3*, suggérant que *Pax3* fonctionne de manière autonome intrinsèque dans la CN [100]. Toutefois, il reste que le mécanisme moléculaire précis par lequel *Pax3* contrôle l'expansion de la population prémigratoire de la CN n'est pas bien compris. *Pax3* fonctionne en tant que facteur de transcription et donc l'identification des cibles de *Pax3* pourrait élucider son rôle dans les défauts du développement du TN et de la CN.

D'autres études ont été effectuées pour étudier les mutations sur les autres souris *Splootch* (voir ci-haut) et ont permis de déterminer que le point commun de toutes les mutations *Splootch* est la formation de transcrits aberrants qui rendent non fonctionnelle la protéine PAX3 [118]. Chez l'humain, on retrouve les mutations dans *Pax3* dans le syndrome de Waardenburg (WS) de type I et III, dont le phénotype comprend des défauts caractéristiques de pigmentation dans les cheveux, analogue à la tache blanche des souris *Splootch*, la peau et les iris, une surdité neurosensorielle congénitale, une légère dysmorphogénèse craniofaciale et occasionnellement des malformations cardiaques [123]. La plupart des phénotypes caractéristiques du syndrome de Waardenburg sont liés à des défauts dans le développement de la CN, incluant la formation défectueuse des mélanocytes qui sont impliqués dans la pigmentation de la peau et des cheveux, ainsi que dans le développement de l'oreille interne [123]. Le syndrome de Waardenburg peut aussi être associé à une aganglionose intestinale, appelée maladie de Hirschsprung.

Les souris mutantes pour *Pax3* sont caractérisées par des défauts au niveau du TN et de la CN, tandis que chez l'humain, les mutations dans *Pax3* mènent à des phénotypes qui sont caractéristiques à des défauts dans le développement de la CN. Il va de soi donc que l'étude de *Pax3* est essentielle pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels *Pax3* contrôle la fermeture du TN et le développement de la CN.

1.4.3. Les régulateurs de la transcription de *Pax3*

L'étude de l'induction de *Pax3* pendant la neurulation a démontré que l'expression de *Pax3*, à E8,5, se faisait aux BLPN, ce qui coïncide avec l'endroit où apparaît la CN (Figure 1.11). Les études sur les souris mutantes *Splootch*, telles que mentionnées ci-dessus, ont

démontré que *Pax3* joue un rôle essentiel dans le développement normal de la CN. De nombreuses études effectuées dans les embryons de grenouille suggèrent que *pax3*, en combinaison avec *zic1*, est suffisant pour déclencher le début du CN-GRN [124-126]. Ainsi, la combinaison de toutes les études effectuées chez diverses espèces établit le rôle prépondérant de *Pax3* au niveau de la CN. Beaucoup de recherches se sont attardées afin de comprendre les voies de signalisation qui permettent à la CN d'être induite aux BLPN, ainsi qu'aux mécanismes moléculaires qui établissent et définissent l'expression spatio-temporelle de *Pax3* dans le neuroectoderme au niveau de la CN. Les résultats des études présentées tout au long de ce travail nous permettent d'assembler un modèle dans lequel l'expression de *Pax3* est initiée aux BLPN postérieure en intégrant des signaux postériorisant provenant de la voie de signalisation Wnt- β -caténine (et probablement Fgf et RA) et des niveaux (potentiellement) intermédiaires de signaux provenant de la voie de signalisation BMP. Wnt régulerait potentiellement le contrôle temporel de l'exposition à BMP qui lui, à son tour, permettrait de spécifier les bordures latérales de la plaque neurale [53, 75]. Les patrons d'expression des ligands Wnt et de BMP dans l'embryon postérieur de souris supportent ce modèle. La signalisation par la voie Wnt- β -caténine est active et largement répandue dans la région caudale de l'embryon de souris, mais ne peut pas expliquer la restriction aux BLPN de *Pax3* [127]. La signalisation par la voie BMP, en revanche, est restreinte aux BLPN au niveau de la PNP ouverte [27, 128, 129] et des niveaux intermédiaires, selon certains, sont nécessaires pour induire *Pax3* et les CCNs [71, 97]. De plus, de manière complémentaire, la restriction dorsale de *Pax3* dans le TN est maintenue par des signaux de la voie BMP provenant de l'épiderme, couplé à des signaux de la voie Shh provenant de la notochorde qui empêche l'expression de *Pax3* dans la région ventrale du TN [97, 130].

Il est maintenant connu que les voies Wnt et BMP, ainsi que la voie Shh, sont les principaux signaux provenant des axes AP et DV qui mettent en place l'expression de *Pax3* dans le neuroectoderme caudal. Reste alors à savoir comment cette information est intégrée au niveau des séquences cis régulatrices et par quels effecteurs moléculaires ceci se fait. Pour ces fins, des études ont permis d'identifier la séquence régulatrice minimale dans le génome de *Pax3* permettant de récapituler l'expression de ce gène. Deux régions régulatrices situées sur le locus de *Pax3*, l'une située dans le promoteur et l'autre dans le quatrième intron, sont enrichies en éléments cis régulateurs conservés (ECR) et contiennent des informations

suffisantes pour récapituler l'induction et la restriction dorsale de l'expression de *Pax3* dans le neuroectoderme des embryons de souris [131, 132].

L'analyse, par délétion, du promoteur de *Pax3* a révélé qu'un bloc de 674pb, dans le promoteur proximal de 1,6 Kb de *Pax3*, contient deux ECR d'environ 250pb, appelé Neural Crest Enhancer 1 et 2 (NCE 1 et 2) [133]. Lorsque combinés, ces NCE1 et 2 sont suffisants pour non seulement récapituler l'expression de *Pax3* dans le TN et dans les CCNs des embryons de souris, mais sont capables de générer des niveaux fonctionnels de *Pax3* suffisants pour corriger les défauts causés par les souris *Splotch* au niveau du TN et de la CN [100, 133]. La comparaison des séquences des NCE1 et 2 a révélé qu'elles étaient hautement conservées entre la souris et l'humain. Des études effectuées sur les embryons de poisson-zèbre ont démontré que l'intron 4 de *Pax3* contiendrait au moins deux ECR qui semblent présenter des activités complémentaires aux NCE1 et 2 afin de récapituler l'induction et la restriction dorsale de l'expression de *Pax3* dans le neuroectoderme [130]. Toutefois, l'étude de leur délétion n'a pas encore été menée et donc l'exigence de l'un des ECR présents dans l'intron 4 de *Pax3* n'est pas encore connue.

Une fois les séquences cis régulatrices connues (NCE1 et 2), il restait à découvrir les facteurs de liaison à l'ADN qui pouvaient réguler ces éléments conservés. Le NCE1 contient des sites de liaison pour le facteur de transcription PBX, qui semble être requis spécifiquement pour contrôler l'expression du promoteur 1,6 Kb de *Pax3* dans les rhombomères et les CCNs cardiaques prémigratoires [134, 135]. Le NCE2, quant à lui, contient des sites de liaison pour le facteur de transcription TEAD qui semble critique pour l'activité de l'ensemble du NCE1 et 2 dans les embryons de souris transgéniques à E10,5 [133]. De plus, le NCE1 et 2 contiennent des sites de liaison pour les facteurs de transcription Pou de classe III, soit BRN1 et BRN2, qui sont nécessaires pour l'activité du promoteur proximal de 1,6 Kb de *Pax3* le long de l'axe rostro-caudal dans les embryons transgéniques de souris à E9,5 [135]. De manière surprenante, la délétion ciblée de l'ensemble du NCE1 et 2 dans les embryons de souris n'a pas affecté l'expression de *Pax3* [132].

1.4.4. Le mécanisme moléculaire de l'induction de *Pax3*

Une fois que les séquences régulatrices de *Pax3*, ainsi que les signaux instructeurs nécessaires à son expression sont connus, le mécanisme moléculaire par lequel ces signaux (Wnt et BMP) induisent l'expression de *Pax3* aux BLPN postérieur reste à être établi.

Wnt a un rôle postériorisant dans l'induction de la CN. Au niveau caudal, ceci pourrait se faire à travers certains facteurs de transcription qui sont leurs cibles premières, notamment les gènes *Cdx*. Les gènes *Cdx* (Caudal-related homeobox) sont une famille composée de trois gènes *Cdx*, soit *Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4*, qui, chez la souris, sont tous co-exprimés dans la partie caudale des embryons au début de la neurulation. Leur expression suit un gradient : ils sont faiblement exprimés au niveau antérieur et fortement exprimés au niveau postérieur [136, 137]. C'est *Cdx1*, à E8,5, qui circonscrit la limite antérieure de l'expression des *Cdx*, soit à la limite du cerveau postérieur (rhombencéphale) et de la moelle épinière et l'expression des *Cdx* régresse de manière caudale au fur et à mesure que l'embryon s'allonge [136, 137]. Il a été démontré que les trois *Cdx* sont impliqués dans la structuration de l'axe AP durant le développement embryonnaire. Les souris *Cdx1*^{-/-} présentent des changements dans les gènes homéotiques antérieurs qui provoquent des anomalies au niveau du squelette axial cervical [138]; les mutations dans le gène *Cdx2* mènent à des troncatures au niveau postérieur et perturbent la structuration axiale des structures embryonnaires [139]; les souris *Cdx4-nulle* n'ont qu'une transformation antérieure faible à une position thoracique spécifique [140]. De plus, il a aussi été démontré que les *Cdx* jouent un rôle essentiel dans l'allongement axial postérieur chez la souris [140, 141]. Des études [142-145] ont démontrées que l'expression des *Cdx* est régulée par les signaux postériorisant de la voie Wnt canonique; ces signaux jouent des rôles essentiels et directs dans la régulation de l'expression des *Cdx* chez la souris. D'autres membres de la voie Wnt canonique sont essentiels pour le TN au niveau caudal et l'élongation de l'embryon. La mutation ciblée de β -caténine réprime l'expression de *Pax3* et *Cdx2* au niveau de la PNP et diminuerait l'expression d'autres gènes cibles, menant à des défauts tels que la troncature de la queue et un spina bifida [146]. Les embryons homozygotes pour une mutation dans le gène *LRP6*, qui code pour un récepteur essentiel de cette voie, présentent des défauts au niveau du développement embryonnaire : ils ont un axe AP tronqué

avec perte des somites caudaux et la moitié des embryons ont des DFTN (exencéphalie et spina bifida) [147].

Le rôle des protéines CDX pour transmettre les signaux postériorisant de Wnt à *Pax3* a été démontré par les recherches effectuées dans ce laboratoire (Nicolas Pilon). Ces recherches ont permis de démontrer que chez la souris, *Pax3* est une cible indirecte de la voie Wnt et que les protéines CDX, en aval de la signalisation Wnt- β -caténine, peuvent activer directement l'expression neurale de *Pax3* via le NCE2 décrit précédemment [145]. Qui plus est, cette étude a démontré que la région du NCE2 est capable, à elle seule, de récapituler à la fois l'induction et la restriction dorsale de l'expression de *Pax3* dans le TN et la CN caudale. Les études effectuées dans le laboratoire de Nicolas Pilon démontrent, en outre, qu'en plus des CDX, les protéines ZIC2 régulent directement l'expression de *Pax3* chez la souris et agissent en tant que cofacteur neural de CDX. La région du NCE2 intègre les signaux caudaux de CDX, dorsaux de ZIC2 et neuraux de SOX2 [148]. Et encore, ces recherches démontrent que ZIC2 agit en tant que médiateur de la signalisation par Shh, impliqué dans la restriction dorsale de l'expression de *Pax3*. Avec les découvertes faites précédemment sur le NCE2 de *Pax3*, ces données suggèrent que ce court CRC agit en tant que « super-enhancer » qui médie l'induction et la restriction dorsale de l'expression de *Pax3* dans le neuroectoderme caudal.

Toutefois, la question sur la restriction de *Pax3* aux BLPN postérieure persiste toujours, puisque CDX, ZIC2 et SOX2, tout comme la signalisation par la voie Wnt- β -caténine, sont répandus dans l'ensemble de la région caudale de l'embryon de souris, et ne sont pas restreints aux BLPN. Comme la signalisation par la voie BMP est impliquée dans l'induction de la CN et est restreinte aux BLPN au niveau de la PNP ouverte, est-ce que cette voie de signalisation est intégrée au niveau du NCE2 de *Pax3*, permettant ainsi de définir la restriction de *Pax3* aux BLPN? Nonobstant le modèle proposé dans lequel l'induction de la CN aux BLPN requerrait initialement des signaux Wnt, suivi d'une exposition à BMP (régulée par Wnt) il existe plusieurs exemples dans le développement embryonnaire où les signaux Wnt et BMP interagissent ensemble.

La voie Wnt peut agir directement sur un effecteur de la voie BMP. SMAD1 peut recevoir une phosphorylation inhibitrice par la GSK3. Habituellement, lorsque la voie Wnt-canonique n'est pas active et/ou est inhibée, la GSK3 phosphoryle des protéines qui sont déjà phosphorylées, comme c'est le cas pour la β -caténine. Pour les SMAD1/5, la MAPK procure

cette phosphorylation initiale qui permettra la phosphorylation subséquente par la GSK3. Une fois que ces deux phosphorylations ont lieu, SMAD1 est dégradé, abrogeant le signal BMP/SMAD1. Puisque la voie Wnt canonique empêche cette fonction de la GSK3 en présence de Wnt, la stabilité de SMAD1 est augmentée et permet au signal BMP/SMAD1 d'être prolongé [23, 149]. Lors de la gastrulation, la voie de signalisation BMP détermine l'intensité du signal de manière DV. Les recherches effectuées dans le laboratoire de De Robertis, 2007, ont démontré qu'au niveau de l'axe AP, les Wnts prolongent la durée du signal BMP/SMAD près de la PNP, par le mécanisme présenté ci-haut, tout en diminuant la durée de ce signal antérieurement, ceci dû au gradient d'activité postériorisant des Wnts [23, 149]. Ainsi, le modèle de ce groupe fournit une explication moléculaire possible pour la coopération entre les signaux des axes DV (BMP) et AP (Wnt). Au niveau de l'appareil digestif, il a été démontré que la voie BMP interagit étroitement avec les CDX. La métaplasie non spécialisée de l'œsophage est un précurseur de la métaplasie intestinale, et une interaction pSMAD/CDX2 est nécessaire pour le changement vers la métaplasie intestinale [150]. Il a été montré, dans la métaplasie intestinale, que les ligands BMP2/4 régulent l'expression de *Cdx2* et favorise ainsi la différenciation intestinale [151]. Or, ceci renvoie à la voie de signalisation Wnt, qui est connue pour réguler l'expression des *Cdx*, telle qu'il a été discuté précédemment. Qui plus est, une étude [152] a démontré, à travers des cellules souches embryonnaires, que la voie Wnt coopère avec BMP pour permettre l'expression des *Cdx* et ainsi promouvoir le destin hématopoïétique de ces cellules. De plus, l'effet coopératif de Wnt-BMP sur l'expression de *Cdx* est aussi évident chez les embryons de poisson-zèbre [152]. Ainsi, les voies Wnt et BMP sont impliquées dans l'activation de l'expression des *Cdx*. De plus, il a été démontré que les signaux Wnt- β -caténine et BMP-SMAD peuvent converger sur un promoteur commun, comme c'est le cas du promoteur *Msx2* [153].

1.5. Hypothèse et objectif

Meulemans et Bronner-Fraser, en 2004, ont assemblé les données de plusieurs études pour mettre en place un réseau putatif d'interactions et de régulations de gènes qui, à travers des voies de signalisation et des facteurs de transcription, guide la formation de la CN. Ce réseau, avec certaines variations interespèces, est conservé chez les vertébrés [40]. Et encore, alors que la souris est considérée comme un meilleur modèle pour l'étude des défauts liés au TN et à la CN, la plupart des études sur le CN-GRN ont été réalisées chez des espèces non mammifères, principalement dans les embryons de grenouille, poisson-zèbre et de poulet [154]. Qui plus est, malgré ces études, les données restent insuffisantes quant aux mécanismes moléculaires qui régulent les interactions entre les voies de signalisation qui initient le développement de la CN, telles Wnt- β -caténine, FGF et BMP, et les spécificateurs des BLPN, tels *Pax3*, *Zic2/5*, *Msx1/2*. On convient, de plus, qu'un unique CN-GRN pourrait ne pas suffire pour expliquer la formation de la CN à tous les niveaux le long de l'axe AP [39]. Les risques de disparités entre les différents mécanismes moléculaires qui régulent ces interactions sont alors accrus. Ainsi, pour pallier ce manque d'information, il était donc essentiel d'approfondir nos connaissances du CN-GRN chez la souris.

1.5.1. Hypothèse

Les recherches effectuées dans ce laboratoire se sont donc attardées sur le contrôle transcriptionnel du développement précoce du système nerveux. Tel que mis de l'avant par les souris *Spotch*, *Pax3* joue un rôle de premier plan dans le développement du TN et de la CN. Ainsi, on a donc voulu savoir comment sont intégrées les voies de signalisation au niveau des séquences cis régulatrices du promoteur de *Pax3* afin d'initier l'expression de *Pax3* aux bordures latérales de la plaque neurale caudale de la souris. On a déjà démontré que les protéines CDX pouvaient agir comme intermédiaires et relayer l'information positionnelle de la voie Wnt- β -caténine au promoteur de *Pax3* [145]. En plus des CDX, on a démontré que les protéines ZIC2 permettent le maintien de l'expression de *Pax3* chez la souris et agissent en tant que cofacteur neural de CDX et de plus, que la région du NCE2 intègre aussi les signaux neuraux de SOX2 [148]. Toutefois, la question sur la restriction de *Pax3* aux BLPN

postérieures persistait toujours, puisque CDX, ZIC2 et SOX2, tout comme la signalisation par la voie Wnt- β -caténine, sont initialement répandus dans l'ensemble de la région caudale de l'embryon de souris, et ne sont pas restreints aux BLPN. Conformément au rôle de la voie de signalisation BMP lors du développement du TN et de la CN, nous avons estimé que puisque

- 1) la signalisation par la voie BMP est restreinte aux bordures latérales au niveau de la plaque neurale postérieure ouverte [27, 128, 129];
- 2) des niveaux intermédiaires de BMP, selon certains, sont nécessaires pour induire *Pax3* et les CCNs [71, 97];
- 3) les travaux dans les embryons de poulet ont permis d'établir un modèle d'induction de la CN dans lequel le contrôle temporel de l'exposition à BMP, qui serait régulé par Wnt, spécifierait les bordures latérales de la plaque neurale [75];
- 4) nous avons identifié plusieurs sites putatifs de liaison à l'ADN pour SMAD dans le NCE2 du promoteur proximal de 1,6 Kb de *Pax3* [133],

la voie de signalisation BMP, à travers ses effecteurs SMAD, serait le facteur manquant permettant ainsi de restreindre l'expression de *Pax3* aux BLPN. Plus précisément, pendant la formation du TN et l'induction des CCNs, les signaux Wnt et BMP seraient intégrés au niveau du NCE2 de *Pax3* à travers les protéines CDX. Les protéines SMAD1/5 de la voie BMP forment un complexe transcriptionnel avec le complexe CDX, ZIC et SOX déjà décrit [148], ainsi permettant l'intégration de signaux contrôlant l'axe AP et l'axe DV sur la région du NCE2 de *Pax3*.

1.5.2. Objectif et méthodologie

Examiner le rôle de la voie BMP-SMAD dans la régulation transcriptionnelle de *Pax3*.

Pour ce faire, j'analyserai le profil d'activation de la voie BMP-SMAD1/5 au niveau de la plaque neurale ouverte et le NT fermé par immunofluorescence, avec un anticorps anti-phosphoSMAD1/5. Je déterminerai l'importance de la voie BMP dans l'induction de l'expression endogène de *Pax3* en traitement des cellules cultivées en présence ou absence de Wnt3a et de Noggin. J'évaluerai la fonctionnalité de 2 sites de liaison potentiels pour

SMAD1/5 sur le NCE2 de *Pax3* par des essais de retard sur gel ainsi que des essais luciférase. De plus, je déterminerai si SMAD5 se retrouve sur la région du NCE2 de *Pax3* endogène par immunoprécipitation de la chromatine de cellules N2a (lignée cellulaire dérivée des CCNs) et déterminerai si SMAD5 interagit avec CDX1 par co-immunoprécipitation.

Cdx-mediated co-integration of Wnt and BMP signals
on a short neural crest enhancer

(To be submitted)

Emilie Laberge Perrault^{1,2}, Guillaume Bernas¹, Nicolas Pilon^{1,2}

Molecular Genetics of Development Laboratory, Department of Biological Sciences and
BioMed Research Center, Faculty of Sciences, University of Quebec at Montreal¹
Molecular biology, Faculty of Medicine, University of Montreal²

To whom correspondence should be addressed: Nicolas Pilon,
Email: pilon.nicolas@uqam.ca

Author contribution:

Emilie Laberge Perrault: Acquisition, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the article; experiments: all figures in the paper. *Guillaume Bernas*: Certain immunofluorescence analyses of Pax3 and pSmad1/5 expression in NT cryosections. *Nicolas Pilon*: Conception and supervision of the work; revision of the manuscript.

2.1. Abstract

Pax3 is a neural plate border specifier that plays a leading role in the development of the neural tube and neural crest. It has, in its proximal promoter, a small cis-regulatory module (CRM) of ~250bp, called NCE2, that is sufficient to recapitulate the induction of *Pax3* and its restriction to the lateral borders of the neural plate in the mouse caudal neuroectoderm. However, how this short neural crest enhancer integrates cues that explain its restricted expression is not fully understood. Our previous studies have shown that the *Pax3*NCE2 incorporates instructive AP cues from the Wnt pathway, via CDX proteins (CDX1, 2, 4). Here we report a novel role for the transcription factors SMAD1/5 in the regulation of *Pax3*. Our data suggests that the *Pax3*NCE2 can integrate instructive DV cues from the BMP pathway, via SMAD1/5 proteins. In combination with the previously described CDX-ZIC2-SOX2 complex, our study finds that SMAD1/5 is involved in the induction of *Pax3* expression and restrict *Pax3* expression to the lateral borders of the neural plate. In addition to integrating instructive Wnt-CDX AP cues, we show that *Pax3*NCE2 can integrate instructive DV cues from the BMP pathway, in a CDX-dependent manner, via SMAD1/5 proteins. To support this assertion, we provide evidence that the activity of BMP-SMAD1/5 on the expression of *Pax3* is mediated by CDX proteins.

2.2. Introduction

The neural crest (NC) is a multipotent and migratory cell type that is an evolutionary innovation in vertebrates [33]. The presumptive NC is induced by signalling molecules at the border of the neural plate (NP) and the non-neural ectoderm (NNE). During neurulation, the neural plate border (NPB) will elevate and fold to form the closing dorsal neural tube (NT) from which NC cells (NCCs) emerge to give rise to many different derivatives, including melanocytes, bone and cartilage of the face and skull, adrenomedullary cells, as well as sensory and sympathetic ganglia [11, 34, 35]. Pre-migratory NCC originate from different levels along the anterior-posterior (AP) axis and are designated as cranial, vagal, trunk and lumbosacral populations.

Neural crest formation, from its origin at the NPB, to specification, migration and differentiation, is said, according to studies in many different species (xenopus, zebrafish and chick), to be guided by a putative gene-regulatory network (GRN) [34, 35, 40]. It first involves a combination of signals (i.e. Wnt, bone morphogenetic proteins (BMPs), fibroblast growth factor (Fgf)) that induce the expression of genes termed “neural plate border specifiers” that encode transcription factors (such as *Pax3/7*, *Zic1/2*, *Msx1/2*) at the NPB – a broad territory containing cells that will become competent to form the NC. The combinatorial action of signalling molecules and NPB specifiers induce the expression of a second set of transcription factors termed “neural crest specifiers” (such as *Sox9/10*, *FoxD3*) who further define this territory. It is proposed that the NC specifiers, by inducing the expression of NC effector genes, ultimately control NC behaviour, from EMT and delamination to migration and differentiation [34, 35, 38]. Most studies pertaining to the NC-GRN have focused primarily on cranial NC, which appears to be the most conserved among vertebrates [39]. However, not all NCC populations contribute to the same NC derivatives. For example, both cranial and trunk NCC contribute to sensory ganglia and Schwann cells, but only cranial NCCs contribute to bone and cartilage of the face and skull [39]. NCCs of cranial origin can give rise to normal trunk derivatives when transplanted in the trunk [42, 43], whereas NCCs from trunk neural folds transplanted in the cranial region fail to contribute to skeletal lineages *in vivo* [44] and only give rise to cartilage *in vitro* in appropriate culture conditions [45, 46]. The difference between cranial and trunk NCCs is made further evident by cis-regulatory analyses. Analyses of NC specifiers *FOXD3* and *SOX10* of the chick have shown that they have different enhancers that are specific to distinct axial levels. These specific enhancers control *FOXD3* and *SOX10* expression in cranial or in trunk NC of chick embryos, but not at both axial levels. Furthermore, these enhancers are activated by different inputs [33, 47-52]. Given that there are different NCC populations along the AP axis which have different developmental potential and distinct genetic programs, one unique NC-GRN may not account for NC formation at all levels along the AP axis [39] and therefore it is conceivable that a different NC-GRN, more suited for trunk NCC, exists. Furthermore, while the mouse is considered a better model for studying neurocristopathies and human development, most studies pertaining to the NC-GRN have been done in non-mammalian species, mainly in xenopus, zebrafish, and chick [154]. Further understanding of trunk NC-GRN in the mouse is therefore a must.

It has well been established that AP cues from Wnt and Fgf, and dorso-ventral (DV) cues from BMP and Shh (Sonic hedgehog), play important roles at the NC level [22, 63, 69, 91, 97, 124, 155-157]. While instructive AP cues from Wnt signalling have been shown to be key players for the induction of NC, the need for BMP signalling during the induction phase of NC, on the other hand, is of broad and current interest. Seeing as the epidermis is formed at high BMP signalling levels [20] and inhibition of BMP signalling is required for neural tissue differentiation [75, 149], some studies have suggested a gradient model, where intermediate levels of BMP are needed for the induction of NPB specifiers [91, 92, 128]. In contrast, other studies have suggested a “two-signal” model where initial inhibition of BMP is required for NC induction during gastrulation, and later activation of BMP during neurulation is required for dorsal restriction and maintenance of NC [34, 66, 99]. Again, most studies pertaining to this issue have been made in non-mammalian embryos (xenopus, zebrafish, chick). This raises the question: How can the inconsistencies put forth by the various studies on the need, or lack thereof, of BMP signalling during the initial phase of NC induction, be explained?

In the mouse, embryos with a knockout for *Alk3* (*Bmpr1a*), a type 1 BMP receptor, die shortly after gastrulation, rendering impossible the evaluation of NC induction [21] and studies using the *Wnt1-Cre* line can only analyse post-induction events. A *Pax3-Cre* line that conditionally removes *Alk3* in the prospective NC of mouse embryos demonstrated that despite the loss of *Bmpr1a* before neurulation, early NC markers are still induced in the cranial region. In contrast, in the posterior region of mouse embryos, the loss of *Bmpr1a* before neurulation led to a dramatic decrease in NCCs markers and derivatives in the dorsal NT. Normal development is consequently delayed or impaired [99]. Furthermore, studies have shown that BMP signalling, in addition to posteriorizing canonical Wnt signalling, is involved in the induction and dorsal restriction of certain NPB specifier during NC formation [32, 65, 68, 71, 97, 145, 148]. This highlights the inconsistencies between cranial and trunk NC-GRN and further reiterates the need for a better understanding on how signals from these pathways are integrated on specific genes, at all AP axial levels. Pertaining to this, the analysis of *Pax3*'s genomic locus has identified short conserved cis-regulatory modules (CRMs). The 5'-flanking region, at the level of the 1,6 Kb proximal promoter, contains some of these CRMs, named Neural Crest Enhancer 1 and 2 (NCE1, NCE2) [131-133]. The whole NCE region is sufficient to not only recapitulate *Pax3* expression in the NT and NCCs of mouse embryos, but

also to generate sufficient levels of functional *Pax3* to rescue the NT and NCCs defects observed in *Pax3* Splotch mice [100][132]. We have previously demonstrated that the short (~250bp) NCE2 alone was sufficient to recapitulate and direct *Pax3* mouse expression in caudal NCCs and NT [145, 148]. Our results have shown that *Pax3*NCE2 integrates a Wnt-Cdx regulatory axis, in cooperation with positive inputs from NPB specifier *ZIC2* and neural factor *Sox2*, to induce *Pax3* expression in pre-migratory NCCs [145, 148]. However, these studies showed that an unknown factor was required during the induction phase in order to limit *Pax3* expression to the lateral borders of the PNP. In the current study, we show that SMAD1/5 proteins could be that missing factor. We show that the NCE2 region integrates positive inputs from SMAD1/5 proteins, in addition to inputs from CDX, *ZIC2*, as well as SOX2 transcription factors, in order to regulate murine *Pax3* expression in the caudal neurectoderm. Importantly, we show that in addition to integrating instructive AP cues from Wnt signalling, this CRM can integrate instructive DV cues from BMP signalling in a CDX-dependant manner. All in all, these results, combined with the results from our previous studies, indicate that SMAD1/5 proteins, via BMP signalling, could be the missing co-factor in the CDX-dependant expression of *Pax3* and that together, via the “superenhancer” NCE2, they control the dorsal restriction of *Pax3* expression in the mouse caudal neurectoderm.

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Ethics statement

Experiments involving mice were performed following Canadian Council of Animal Care (CCAC) guidelines for the care and manipulation of animals used in medical research. Protocols involving the manipulation of animals were approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Quebec at Montreal [Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA)], reference number 0513-C1-648-0514.

2.3.2. Plasmid constructs and site-directed mutagenesis

The Pax3 cDNA vector pBH3.2 [105] was kindly provided by J. Epstein. Smad5 expression vector (pGEX-Smad5) was kindly provided by P. Briata [158]. FlagSmad1 (propriety vector) was kindly provided by X-H. Feng (Baylor College of Medicine). HA-tagged Zic2 expression vector (pcDNA3-HAZic2) was kindly provided by J. Aruga [159]. Myc-tagged Sox2 expression vector (pcDNA3.1-MycSox2) was a gift from M. Bani-Yaghoub [160]. The PCR product corresponding to the mouse Cdx1 ORF was cloned into pCEP4 expression vector and subsequently cloned into a HA-linker expression vector. HACdx1 and HAZic2 expression vectors co-expressing GFP were generated by subcloning the cDNAs into pIRES2-EGFP vector (Clontech). Wild type (wt), CdxBS and ZicBS mutant versions of a Pax3NCE2-luciferase reporter constructs were as previously described [145, 148]. For generating Smad binding site (BS) mutant versions, point mutations were introduced into the SmadBS of NCE2 by using the Quick ChangeMultisite-directed mutagenesis kit (Stratagene) in accordance with the manufacturer's instructions. The sequences of the oligonucleotides used for site-directed mutagenesis of the SmadBS are presented in Table I (SmadBS underlined and point mutations indicated by lower case letters.)

2.3.3. Immunofluorescence analyses

FVB and C57BL/6J mouse embryos were obtained from timed pregnancies, noon of the day on which a vaginal plug was detected being considered as embryonic day E0.5. Immunofluorescence analyses on NT cryosections were performed according to the protocol from the Ben Allen lab. Briefly, 12 μ m frozen sections were prepared using a Leica CM1950 cryostat (Leica microsystems) and adjacent, or stage matched, sections were used to compare the distribution of Pax3 and pSmad1/5 proteins. Sections were blocked with 3% heat-inactivated normal goat serum, 0.1% TritonX-100 in PBS for 1 h and then incubated at 4 °C overnight with primary antibodies diluted in the blocking solution. Nuclei were stained using DAPI (Molecular Probes) and slides were then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies diluted in the blocking solution. Immunofluorescence analyses of pSmad1/5 distribution on cells were performed as follows. P19, Neuro2a (N2a) and COS7 cell

lines were propagated in 6-well plates and transfected as previously described using Genejuice reagents (Novagen) in accordance with the manufacturer's protocol [145, 148]. A cover slip was placed in the bottom of each well. P19, N2a and COS7 cells were cultured at their appropriate densities [148]. Cells were either left untreated, transfected with 1 μ g of Smad1 expression vector using Genejuice transfection reagent (Novagen), in accordance with the manufacturer's protocol and/or treated the following day with 20ng/mL of recombinant mouse BMP4 proteins (R&D systems) for 24h. Forty-eight hours after transfection, cells were fixed in 4% PFA at 4°C for 7 minutes and washed 3 times in cold PBS. Immunofluorescences were performed on the cell-coated cover slip mounted on slides. Cover slips were blocked with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.1% TritonX-100 in PBS for 1 h. Slides were incubated 1h at RT in primary antibodies diluted in the blocking solution. Nuclei were stained using DAPI (Molecular Probes) and slides were then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies diluted in the blocking solution. Antibodies and dilutions used were: anti-pSmad1/5 1:50 (Cell signaling), Alexa-647 donkey anti-mouse 1:500 (Jackson ImmunoResearch) and Alexa-647 mouse anti-rabbit 1:500 (Jackson ImmunoResearch). Images were taken with a Nikon A1 laser-scanning confocal microscope.

2.3.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

ChIP-ReChIP assays in Neuro2a (N2a) cells were adapted from a previously described protocol [161] using Dynabeads Protein G (Invitrogen). For immunoprecipitation of chromatin from HA-Cdx1- or Smad5-transfected N2a cells, rabbit anti-HA (Abcam, ab91110) and rabbit anti-SMAD5 (Abcam, ab13724) antibodies were used. Anti-Brain lipid binding protein (anti-BLBP; Millipore, ABN14) was used as a negative control of immunoprecipitation. Re-immunoprecipitation (Re-ChIP) was performed using the same antibodies. PCR amplifications were performed using the Taq DNA polymerase (Bio basic) and consisted of 36 cycles of 20s at 95°C, 40s at 60° and 30s at 72°C. The *Pax3*NCE2 forward and reverse primers sequences used for this study are presented in Table I. PCR products were resolved on a 2% agarose gel.

2.3.5. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Two double-stranded end-labeled probes from *Pax3*NCE2 containing putative SmadBS were tested for Smad1/5 binding by EMSA, adapted from previously described protocol [145, 148]. Briefly, five micrograms of nuclear extracts from mock-, Smad1 or 5-, Smad4- or Smad1or5 and 4- transfected COS7 cells, treated with 20ng/mL of recombinant mouse BMP4 proteins (R&D systems) for 24h, were used in each reaction as described previously [143]. Proper protein expression was assessed by Western blot. Binding reactions were performed in accordance with a previously described protocol [162] using 50 000 cpm of probe, 5µg of nuclear extracts, 1µg of poly(dI-dC), and 1µg of BSA 50X prepared in 5mM Hepes pH 7.9, 10% glycerol, 25mM KCl, 0.05mM EDTA and 0.125mM PMSF. The two double-stranded probe harboring the putative SmadBS used are presented in Table I.

2.3.6. Cell culture, transfections and RT-PCR analyses

P19, Neuro2a (N2a) and Cos7 cell lines were propagated and transfected as previously described [145, 148] using Genejuice reagents (Novagen) in accordance with the manufacturer's protocol. Luciferase reporter assays were performed essentially as previously described [145, 148]. For Smad-1 or -5 dose-response assays, N2a (8×10^4 cells/well) and P19 (3×10^4 cells/well) were transfected with 100ng of Pax3NCE2-Luciferase reporter construct alone or with increasing amounts of Smad-1 or -5 (10ng to 50ng) expression vector. Analyses of the synergistic effect between any combination of Cdx1, Zic2 and Sox2 proteins were performed essentially as previously described [145, 148]. For analysis of the synergistic transactivation of Pax3NCE2 by Cdx1, Zic2, Sox2 and Smad-1, -4 or -5 co-expression, fixed amounts of Cdx1 (10ng), HAZic2 (40ng), MycSox2 (50ng) and Smad-1, -4 or -5 (50ng) were used and an empty expression vector was also included to ensure a total of 200 ng of DNA per well. All transfections for luciferase assays were performed at least 6 times in triplicate. In all experiments, specificity of NCE2 activation was assessed by using a previously described luciferase reporter construct consisting of the Pax3 150bp minimal promoter alone [145] as a negative control. Forty-eight hours after transfection, cells were disrupted in 100µL of lysis buffer (0.1 M Tris [pH 8.0], 1% Igepal, 1 mM dithiothreitol) and assessed for luciferase

activity with a Berthold LB9507 luminometer (Berthold Technologies). Expression of exogenous Cdx1, HAZic2, MycSox2 and Smad-1, -4 or -5 in cell lysates was verified by western blot. For dose–response assays of Wnt3a- and BPM4-induced expression of *Pax3*, P19 cells were seeded in 12-well plates (8×10^4 cells/well) containing a Wnt3a- or a control-conditioned medium [143]. Cells were treated the following day with varied doses (25-200ng/mL) of recombinant mouse noggin proteins (R&D systems). Cells were harvested 24h post-treatment, snap frozen, and stored at -80 °C prior to RT-PCR analysis. Total RNA was isolated from frozen cell pellets by using the RNeasy kit (Qiagen), and cDNA was synthesized using a poly(dT) oligonucleotide and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) in accordance with manufacturer’s protocols. All dose-response assays were performed at least 4 times. PCR amplifications were then performed with Taq DNA polymerase (Bio basic) and consisted of 25-35 cycles of 20s at 95°C, 40s at 60° and 30s at 72°C. Amplified bands were size-fractionated on a 2% agarose gel. The primers used in this study are presented in Table I.

2.3.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 6.0. Differences between means were evaluated by one way ANOVA and classified as: ns (not significant) $P \geq 0.05$; or significant: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$. Error bars indicate s.e.m.

2.4. Results

2.4.1. *Pax3* and *pSMAD1/5* are co-expressed in the caudal neurectoderm

We have previously reported that the dorsal restriction of *Pax3* to the lateral borders of the PNP and more anteriorly, the dorsal NT, could be done by either one of two mechanisms [148]. The first mechanism (mechanism 1) implied that *Pax3* expression in the lateral PNP and dorsal NT could be established by a collaboration between CDX and one or several proteins who have a more-or-less restricted expression pattern. The second mechanism (mechanism 2) implied that restriction of *Pax3* might be achieved by a collaboration between

CDX and a negative input from a repressor expressed in the medial PNP and ventral NT. The restriction of *Pax3* could also possibly be achieved by the concerted action of both mechanisms. Our previous results demonstrated a putative role for *ZIC2/5* as mediators of the Shh-induced repressive input involved in the dorsal restriction of *Pax3* expression [148], but these results cannot account for the restricted expression domain of *Pax3* to the lateral borders of the PNP because *Zic2* is broadly expressed in PNP and dorsal NT while the expression of *Pax3* is already restricted to the lateral borders of the PNP and more anteriorly, the dorsal NT. Seeing as DV instructive cues from BMP and Shh signalling are involved in the dorsal restriction of *Pax3/7* [97, 130, 148], and that BMP ligands are restricted to the lateral borders of the PNP [27, 128, 129], we hypothesized that pSMAD1/5 transcription factors might contribute to mechanism 1. We carried out an analysis of the expression pattern of *Pax3* and pSMAD1/5 in stage-matched, or sequential, dorsal NT and PNP 12 μ m sections of e9.5 mouse embryos using *Pax3* and pSMAD1/5 antibodies (Fig 2.0). This analysis revealed a striking and extensive overlap of the expression domain of both *Pax3* and pSMAD1/5 along the AP axis. *Pax3* and pSMAD1/5 are found to be equally expressed in the lateral borders of the PNP, as well as in the dorsal NT (Fig 2.0A-B). This data supports the candidacy of pSMAD1/5 in regards to mechanism 1 and further suggest that pSMAD1/5 might be involved in both the induction and dorsal restriction of *Pax3* expression in the caudal neuroectoderm.

2.4.2. Robust activation of *Pax3*NCE2 requires a positive input from SMAD1/5

We, and others, have previously shown that the *Pax3*NCE2 CRM is sufficient for recapitulating the induction and dorsal restriction of *Pax3* expression in the caudal neuroectoderm [100, 133, 145, 148]. In accordance to the pSMAD1/5 expression pattern observed in Fig 2.0, the ~ 250 bp NCE2 CRM [133] was analysed in order to determine if any potential BMP-SMAD binding site (BS) was present. Two SMAD-binding elements (SBE: AGAC, GTCT) were found (Fig 2.1). Although SMAD3 (TGF- β SMAD) and SMAD4 (co-SMAD) are usually found to directly bind to these SBE, and BMP-SMADS usually bind to GC-rich sequences of target gene [163], SMAD1 has been shown to bind to a similar SBE than that of SMAD3/4 [78, 164]. In certain promoters, notably *Id1* and *Id2* promoters, the BMP-responsive region has been shown to contain two critical motifs – the SBEs and GC-rich

boxes [163, 165-167]. It has also been said that in certain BMP target genes, SMADS may regulate transcription through indirectly binding to DNA with other transcriptional factors [78]. As we hypothesised that BMP-SMADS are the missing CDX cofactor for the restriction of the *Pax3* expression domain, we reasoned that SMAD1/5 should be able to activate *Pax3* expression via this short CRM. We tested this hypothesis via luciferase assays in N2a cells but found that SMAD1/5 alone does not transactivate a *Pax3*NCE2 reporter in a dose-dependent manner (data not shown). We then hypothesized that in order for phosphorylated BMP-SMAD transcription factors to activate *Pax3* expression, it should require the concerted action of CDX and its co-factors (ZIC2, SOX2). We assessed this via luciferase assay in both N2a and undifferentiated P19 cells, as well as in the fibroblast-derived COS7 cell line (Fig 2.2). In N2a cells, any double combination of these four transcription factors resulted in an increased activation of the *Pax3*NCE2-luciferase reporter, in comparison to each transcription factor alone [148] (Fig 2.2A). A further increase was noted with all triple combinations. The combination of CDX1, ZIC2 and SOX2 resulted in a similar ratio as previously described (Fig 2.2A) while a very significant synergistic effect was observed (~150 fold) when the four factors were co-expressed (Fig 2.2A). Similar results were obtained when SMAD4, the co-SMAD, was used in these assays (Fig 2.2B). We sought to determine whether the co-expression of these four transcription factors was sufficient to transactivate the *Pax3*NCE2-luciferase reporter in undifferentiated P19 cells. Our previous results had demonstrated that no synergy, and no significant fold activation, was observed when a combination of CDX1, ZIC2 and SOX2 were used to activate of the *Pax3*NCE2-luciferase reporter in undifferentiated P19 cells [148]. These results supported the idea that the capacity to transactivate this short CRM relied on the presence of yet another neural factor. We co-transfected undifferentiated P19 cells with all four transcription factors (SMAD1/5, CDX1, ZIC2 and SOX2) and evaluated the activation of the *Pax3*NCE2-luciferase reporter. The combination of all three previously demonstrated transcription factors (CDX1, ZIC2 and SOX2), with the addition of SMAD1/5, was shown to be able to significantly transactivate (~ 80 fold) the *Pax3*NCE2-luciferase reporter in these cells (Fig 2.2C). These results indicate that the capacity to transactivate this CRM relies on the additional presence of SMAD1/5. This experience was also conducted in COS7 cells, a fibroblast-derived cell line that is not of neural or undifferentiated character. Any combination of these four factors yielded non-significant activation of the *Pax3*NCE2-

luciferase reporter and therefore no cooperative effect between any of the factors was observed (Fig 2.2C). These findings are in accordance with results demonstrating that BMP signalling is not constitutively active in COS7 cells (Fig 2.7).

Together, these results suggest that *Pax3*NCE2 is robustly transactivated by the concerted actions of CDX1, ZIC2, SOX2 and SMAD1/5 transcription factors in neural-specific cells (N2a) and in cells that can be induced to differentiate into neural lineages (P19) [131, 135].

2.4.3. *Pax3* activity is enhanced by the BMP-canonical pathway in *Wnt3a* treated undifferentiated P19 cells

Previous studies have reported that neural *Pax3* expression is induced by canonical Wnt signals [65, 70, 71] and we have previously shown that the NPB specifier *Pax3* is an indirect target of Wnt- β -catenin signalling and implicate CDX members as mediators of the Wnt inductive signals. In accordance with studies that suggests BMP signalling in NC development acts as a gradient, with intermediate levels of BMP molecules during induction in the neural plate [91, 92, 128], we hypothesized that the combinatorial signalling from the canonical Wnt and BMP pathways could further induce *Pax3* expression. To evaluate the potential contribution of the BMP canonical pathway in this process, we performed a series of semi-quantitative RT-PCR analyses in P19 cells. P19 cells have been previously used to study the regulation of *Pax3* expression in the context of neural differentiation [131, 133, 135] and activation of the Wnt- β -catenin pathway [168]. The N2a cell line could not be used for this assay because the canonical Wnt pathway is constitutively activated in these cells due to *Wnt7a* autocrine regulation [169, 170] and because pSMAD1/5 activity is also constitutively activated in these cells (Fig 2.5). The COS7 line could not be used because no known green monkey *Pax3* have been sequenced, although pSMAD1/5 activity is shown to be BMP4 dependant (Fig 2.7). Initially, we wanted to observe the effects of increasing levels of BMP activity alone on *Pax3* expression, but seeing as pSMAD1/5 activity is constitutively activated in P19 cells (Fig 2.6), regardless of treatment, this was impossible. To circumvent this problem, we treated P19 cells with an increasing dose of Noggin (0-200 ng/mL) in order to establish intermediate levels of BMP activity. As shown in Fig 2.3A, treatment of P19 cells

with gradually higher doses of Noggin revealed that *Pax3* expression, 24h post-treatment, is increased in a dose-dependant manner. This resulted in a ~2-3 fold change in *Pax3* mRNA expression levels (Fig 2.3B control). We have previously demonstrated that *Pax3* is induced by Wnt3a after 18h [145] and we therefore wished to see whether the Wnt- β -catenin pathway and the BMP pathway had concerted effects on *Pax3* activation. We performed a series of semi-quantitative RT-PCR analyses in P19 cells treated with increasing doses of Noggin (0-200 ng/mL) in the presence of Wnt3a-conditioned medium, which is known for activating the canonical pathway [143, 171]. In order to see the concerted effect, we allowed *Pax3* Wnt- β -catenin-mediated induction to be achieved beforehand. When treated with Wnt3a-conditioned medium as well as increasing doses of Noggin, it was revealed that by slightly decreasing BMP activity, we could achieve a significant fold change in *Pax3* mRNA expression (~4 at 50ng/mL of Noggin) (Fig 2.3B Wnt3a). The Wnt3a-conditioned medium did not significantly affect *Pax3* mRNA expression when cells were treated with high levels of Noggin (200ng/mL). Taken together, these results indicate that expression of the neural plate border specifier *Pax3* under the control of Wnt- β -catenin signalling is further enhanced by the BMP pathway.

2.4.4. *SMAD1/5-induced expression of Pax3 implicates CDX members as mediators*

EMSA were then used to determine whether SMAD1/5 can directly bind to the *Pax3*NCE2. Seeing as the two SMAD-binding elements (SBE: AGAC, GTCT) found at *Pax3*'s NCE2 genomic locus are the preferred targets for SMAD3 and SMAD4, we wanted to see if SMAD1/5 directly binded to these SBE. As a positive control, we used a BMP-responsive region from the *Id1* and *Id2* promoters that has been shown to contain two critical motifs – SBEs and GC-rich boxes [163, 165-167] – bound by SMAD1/5 proteins. EMSAs were performed on the two probes containing the SBE as well as on the control probe, as no other GC-rich (GCCGnCGC, or of the sort [78]) were found in the *Pax3*NCE2. The results, as shown in Fig 2.4A, reveal that although binding did occur on the control probes, binding of SMAD1/5 was non-specific on the two NCE2 probes. It has been said that in certain BMP target genes, SMADs may regulate transcription through indirectly binding to DNA with other transcriptional factors [78]. We assessed this possibility by mutating the two putative SmadBS

found in *Pax3NCE2*. Interestingly, mutation of these two putative BS had no effect on the significant synergistic activation of the *Pax3NCE2*-luciferase reporter by the combination of all four TF (as seen in Fig 2.4B).

We have previously demonstrated that mutation of the three functional CdxBSs alone, or in combination with the mutation of the ZicBS, significantly abrogates the CDX1–ZIC2 cooperative effect [145]. Therefore, we wanted to know if the same was true when all four TF were co-transfected, or if the presence of SMAD1/5 could circumvent this abrogation. As seen in Fig 2.4D, and in accordance with previous results, the synergistic activation of the *Pax3NCE2*-luciferase reporter was significantly abrogated when the three functional CdxBS were mutated, even in the presence of SMAD proteins. This is consistent with the central role of CDX proteins in activation of *Pax3NCE2* [145] and suggests that binding of CDX1 to this CRM is important for the role of SMAD on the activation of *Pax3*. Because mutation of the two putative SmadBS had no effect on the synergistic activation of the *Pax3NCE2*-luciferase reporter, and in order to validate our hypothesis that BMP-SMAD activity is mediated through CDX1, we sought to determine whether SMAD5, like CDX proteins, occupies the endogenous *Pax3NCE2* genomic locus using a ChIP-ReChIP-PCR assay. To this end, we used Anti-HA-, anti-Smad5- and anti-BLBP (control)- immunoprecipitated chromatin extracts from HACDX1- and SMAD5- transfected N2a cells. Single chromatin immunoprecipitation were purified and amplified by PCR using primers flanking the *Pax3NCE2* region (lanes 4 and 7). Purified anti-HA- and anti-BLBP- immunoprecipitated chromatin extracts from HACDX1- and SMAD5- transfected N2a cells were also re-ChIP'ed using anti-HA, anti-Smad5 and anti-BLBP antibodies, and again analysed by PCR using primers flanking the *Pax3NCE2* region (lanes 2, 3, 5 and 6). As shown in Fig 2.4D, *Pax3NCE2* was specifically amplified in sonicated chromatin samples immunoprecipitated with either anti-HA or anti-Smad antibodies, while no amplification was obtained when a control antibody was used for ChIP. Furthermore, when we re-ChIP'ed the first HA-Cdx1-IP against a control or Smad5 antibody, it was revealed that there was protein interaction between CDX1 and SMAD5 specifically on the endogenous *Pax3NCE2*. Altogether, these results strongly support the idea that Smad5 is present at the endogenous *Pax3NCE2* and that its action is mediated by CDX members.

2.5. Discussion

In this work, we provide an important role for BMP-SMAD1/5 in the regulation of *Pax3* expression in the caudal neurectoderm. Combined with the results from our previous studies [145, 148], SMAD1/5 proteins, via BMP signalling, could be the missing co-factor in the CDX-dependant expression of *Pax3* and that together, via the NCE2 “superenhancer”, they control the dorsal restriction of *Pax3* expression in the mouse caudal neurectoderm. To support this claim, we provide novel evidence that BMP-SMAD1/5 activity on *Pax3* expression is mediated by CDX1.

2.5.1. *SMAD1/5 as the missing co-factor for restricted Pax3 expression*

It has been demonstrated [142-144] that *Cdx* expression is regulated by posteriorizing signals from the Wnt canonical pathway; these signals play critical and direct roles in the regulation of *Cdx* expression in mice. Studies in xenopus and chick embryos have shown that the expression of *Pax3* is induced in the PNP in response to these posteriorizing signals [68, 70]. In accordance with these results, we have previously demonstrated that posteriorizing Wnt signalling, mediated by CDX proteins, is necessary for *Pax3* expression in the trunk neurectoderm [145, 148]. This Wnt-Cdx regulatory axis also requires positive inputs from *Zic2* and *Sox2*. However, our previous studies have shown that a Shh-Nkx-dependent mechanism (the aforementioned mechanism 2, involving ZIC2 proteins) is involved in the maintenance, not the induction, of the dorsally restricted *Pax3* expression domain in the NT. Therefore, the spatiotemporal induction of *Pax3* to the lateral borders of the PNP necessitates an additional factor. Although much debate has been put forth in recent years regarding the role of BMP signalling during the induction of the NC, mainly centering on whether or not DV cues from BMP signalling are needed during the initial phase of NC induction, prevailing studies [71, 91-94] have suggested that BMP signalling plays a role in NC induction, notably on the induction of NPB specifiers. This idea was notably supported by the expression pattern of BMP ligands around the NPB in developing mouse embryos [27, 129]. Accordingly, and consistent with results observed in developing chick embryos [22], our results show that the effectors of the BMP canonical pathway, pSMAD1/5, are present in the dorsal NT and at the

lateral borders of the PNP of E9,5 developing mouse embryos (Fig 2.0B). Not only are pSMAD1/5 present, these results show that they co-localise at all aforementioned levels with *Pax3*. The presence of pSMAD1/5 and its co-localisation with *Pax3*, in the dorsal NT and at the lateral borders of the PNP are consistent with a role in NC induction. Conditionally removing *BMPRIa* in future NC with the use of the *Pax3-Cre* reporter line, and therefore abrogating BMP signalling, demonstrates that BMPRIa activity is necessary for NC development *before* neurulation in the posterior region, as the loss of this receptor leads to a lack of early NCC markers and differentiating NCC derivatives [99]. The spatial distribution of SMAD1/5 demonstrated in Fig 2.0B therefore seems to argue in favour of SMAD1/5 proteins as the missing co-factor needed to limit *Pax3* expression to the lateral borders of the PNP and suggests a role for BMP signalling in the induction phase of NC in the posterior region of the developing embryo.

The present study further demonstrates that, although a CDX1-ZIC2-SOX2 complex has the ability to induce a robust activation of the *Pax3*NCE2-luciferase reporter [145], the addition of SMAD1/5 as a co-factor strongly accentuates this robust activation in neural cells (Fig 2.2a). P19 cells have been previously used to study the regulation of *Pax3* expression in the context of neural differentiation [131, 133, 135] and activation of the Wnt- β -catenin pathway [168]. Just like CDX proteins can activate *Pax3* expression in non-neural P19 cells [145], the addition of SMAD1/5 to this (CDX1-ZIC2-SOX2) complex can induce *Pax3* expression in undifferentiated P19 cells (Fig 2.1c). These results, coupled with the position of pSMAD1/5 in the posterior embryo, suggest that *Pax3* expression, and its restriction to the lateral borders of the PNP, requires instructive cues from BMP-SMAD1/5 signalling.

2.5.2. *CDX proteins as mediators of the BMP-SMAD instructive signal*

Our data indicates that the SMAD1/5 effect on *Pax3* expression is independent of DNA binding, a notion somewhat different, albeit not impossible [78], from the traditional BMP signalling modus operandi (Fig 2.4a,b). Rather, CDX proteins possibly mediate this effect. We consistently saw that mutations of the CdxBS in the *Pax3*NCE2-luciferase reporter abrogated the strong synergistic activation of *Pax3*NCE2 expression (Fig 2.3d, [145, 148]), rendering these CdxBS indispensable for *Pax3*NCE2 activity. The indispensability of CDX

proteins is strengthened by our ChIP-ReChIP experiments on the endogenous NCE2 in neural-specific cells. Our results indicate that not only is SMAD5 present at the endogenous *Pax3*NCE2, but that CDX1 and SMAD5 are present in a same protein-DNA complex (lane 5, Fig 2.3c). This is a probable explanation mechanism as to why SMAD1/5 alone could not transactivate a *Pax3*NCE2 reporter in a dose-dependent manner and further strengthens the notion that CDX proteins have a pioneer-like activity required to attract and tether specific transcriptional activators on this CRM [172].

Our data, which supports the hypothesis that CDX proteins act as mediators for the integration of Wnt and BMP signals, are in agreement with a model of NC induction put forth by studies made in chick embryos. These studies [53, 75, 76] show that the temporal control of exposure to BMP, regulated by Wnt, would specify the lateral edges of the NP. The induction of the cells to lateral edges of the NP would firstly requires Wnt signal, which induces the caudal character to these cells, followed by BMP signalling that specifies the cells at the NPB. It is well-known that the Wnt gradient along the AP axis plays a posteriorizing role during embryonic development [7, 14, 53, 59, 60], permitting cells to acquire caudal character. In addition, we have previously shown that caudal *Pax3* is induced in response to these posteriorizing signals [145]. A model in which subsequent BMP signalling, via SMAD1/5 and mediated by CDX proteins would instruct these cells to acquire NPB fate (as monitored by *Pax3* expression) is consistent with our results. The restricted expression of pSMAD1/5 to the lateral borders of the PNP, the abrogated transactivation of *Pax3*NCE2 when CdxBS are mutated and the CDx1-SMAD5 protein-DNA complex found at the endogenous *Pax3*NCE2 supports this model of NC induction. Moreover, this model does not exclude the possibility that intermediate levels of BMP signalling are required for this induction, as suggested by prior studies [71, 92-94]. Indeed, we have observed that once Wnt/CDX-mediated *Pax3* expression is induced in undifferentiated P19 cells, modulation of BMP signalling activity, can further enhance this effect (Fig 2.3B). As BMP signalling is constitutively active in P19 cells, a point could be made that the endogenous BMP signalling could provide the minimum signalling needed in order to induce the Wnt-mediated *Pax3* expression previously shown [145].

Great debate concerning NC induction and the NC-GRN stems from the fact that there is a greater temporal separation between mice and other species, such as xenopus, zebrafish, and to a lesser extent, chick. Although mice are found to be better models for studying neurocristopathies, data collected in mice sometimes differ from data obtained in other species. It is not yet known whether these differences are fundamental differences between mammalian and non-mammalian or not, although this seems unlikely due to conserved mechanisms between other species [154]. Furthermore, the fact that distinct NC-GRN are likely to exist at different AP axial levels further nourishes this debate. The results obtained in this study helps to bridge the gap between mouse and chick NC induction [53, 75], in addition to supporting a model found in xenopus, zebrafish and chick embryos [71, 92-94], in which intermediate levels of BMP are necessary for this induction. Although the results from this study stem from *in vitro* research, the data compiled here provide a steppingstone for further guided *in vivo* research.

All in all, this work demonstrated an *in vitro* role for the integration of instructive DV cues from the BMP pathway at the level of the *Pax3NCE2*. Coupled with the instructive Wnt-Cdx AP cues previously demonstrated [145, 148], our data indicates that the *Pax3NCE2* serves as a good model to further understand how AP and DV instructive cues can be coordinately integrated on a single short CRM.

2.6. Acknowledgments

The authors thank Denis Flipo (Université du Québec à Montréal) for assistance with confocal imaging. This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research.

2.7. Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

2.8. Figures

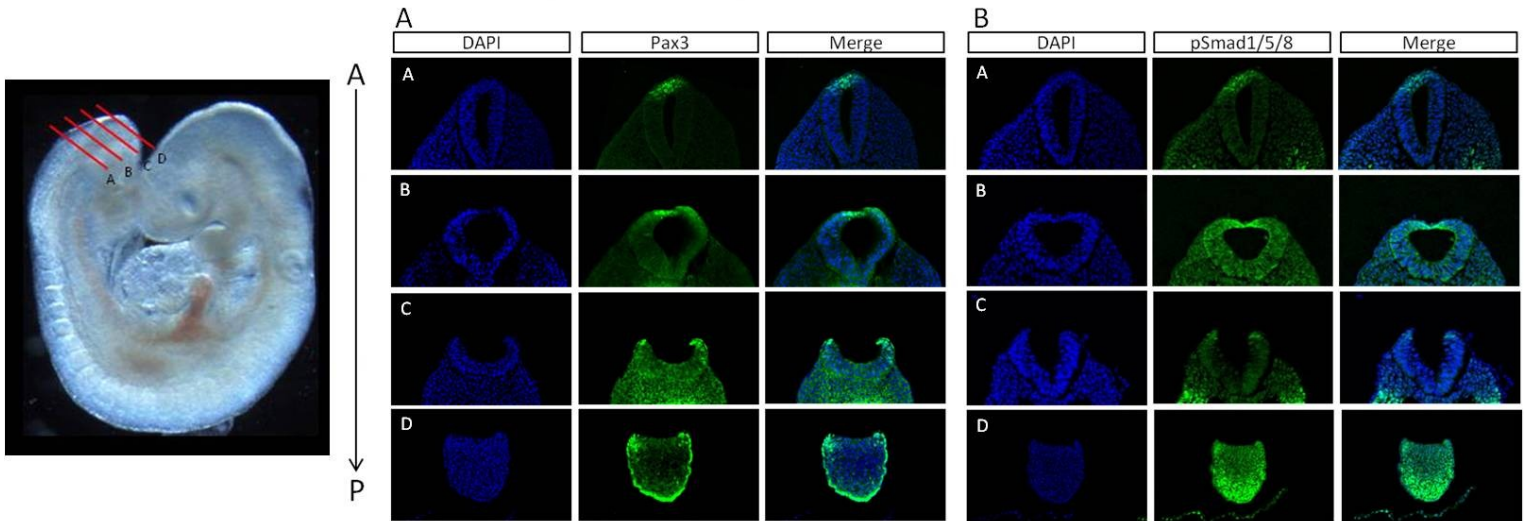


Figure 2.0 *Pax3* and pSMAD1/5 are co-expressed in the caudal neurectoderm during the early steps of NT and NCC formation.

A and B, immunofluorescence analysis of *Pax3* and pSMAD1/5 distribution in caudal sections of E9,5 mouse embryo. The red lines in the left panel indicate the AP level at which the 12 μ m cryosections (shown on the right) were made (a, b, c, d); the section A in the right panel delimits the more anterior NT structure, while the section D delimits the open PNP structure. Note that the *Pax3* and the pSMAD1/5 domains are limited to the lateral borders of the PNP (c and d) and to the dorsal part of the NT (a and b). AP: anterior-posterior, NT: neural tube, PNP: posterior neural plate.

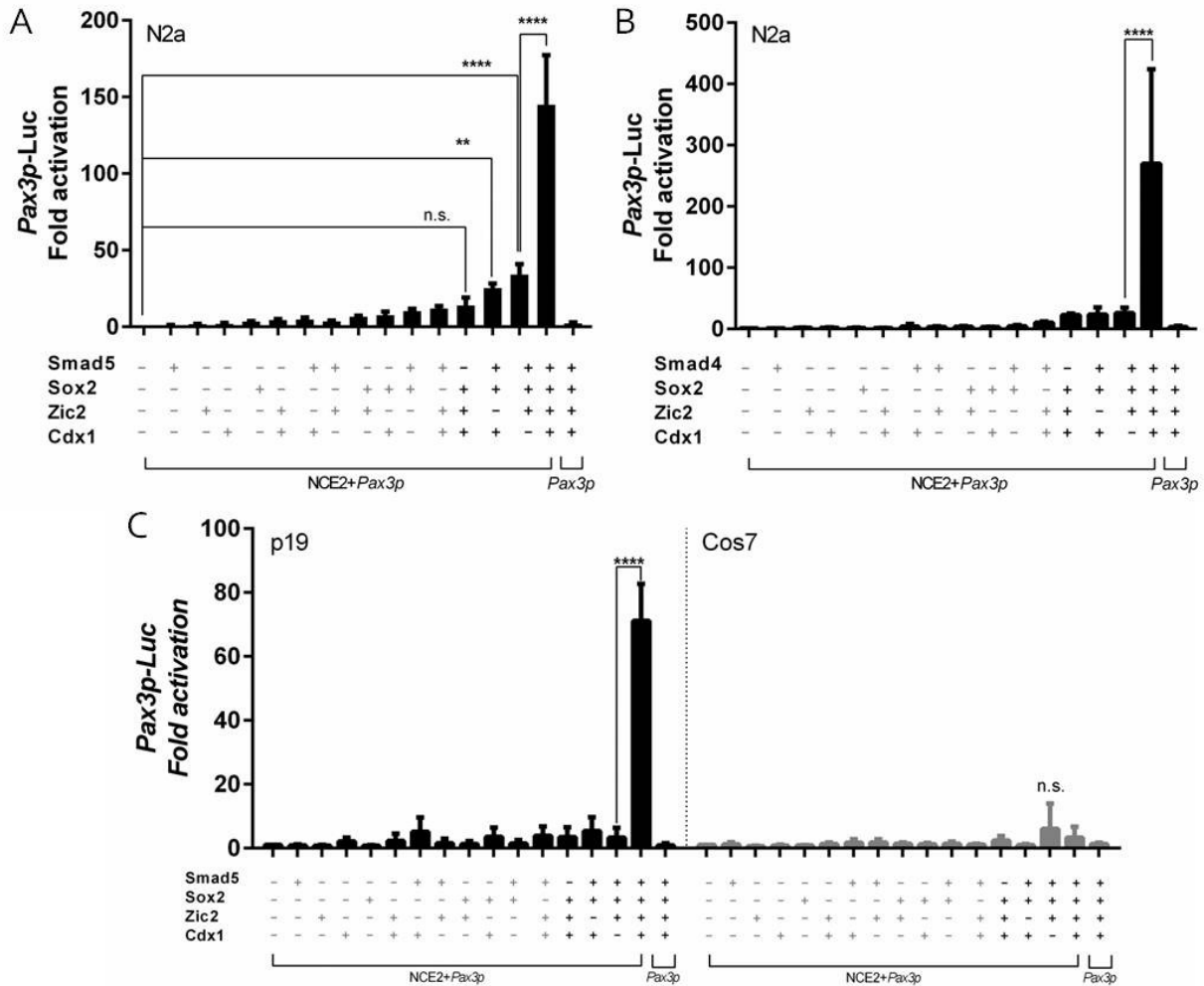


Figure 2.2 Robust activation of *Pax3*NCE2 requires a positive input from SMAD1/5.

A, B and C, Cells were transiently transfected with the *Pax3*NCE2-luciferase reporter alone or co-transfected with FLAGCdx1, HAZic2, MycSox2 or Smad-1, -4 or -5 expression vectors, alone or in every combination. A and B, Transactivation of *Pax3*NCE2-luciferase reporter in N2a cells. (A) Two combinations of three proteins (SMAD1/5, SOX2 and CDX1; SMAD-1, -4 or -5, SOX2 and ZIC2) resulted in a small synergistic transactivation of *Pax3*NCE2 in N2a cells. The importance of BMP-SMAD1/5 on the transactivation of *Pax3*NCE2-luciferase reporter was shown when all four transcription factors were co-transfected in N2a cells. A very significant synergistic effect was observed (~150 fold). (B) When SMAD4 was used instead of SMAD-1 or -5, similar results as those observed in (A) were obtained. (C) Transactivation of *Pax3*NCE2-luciferase reporter in P19 or COS7 cells. Any three-protein combination cannot activate *Pax3*NCE2-luciferase reporter in undifferentiated P19 cells, while a very significant synergistic effect (~80 fold) is obtained when all four transcription factors were co-expressed, demonstrating the importance of BMP-SMAD1/5 on the transactivation of *Pax3*NCE2. Any combination of these four factor yielded non-significant activation of the *Pax3*NCE2-luciferase reporter in COS7 cells. In A, B and C, results are expressed as fold activation compared to the relevant reporter vector alone; n = 4-6 independent experiments performed in triplicate; one-way ANOVA: ns P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001; **** P ≤ 0.0001. Error bars indicate s.e.m; *Pax3p* (*Pax3*-minimal reporter).

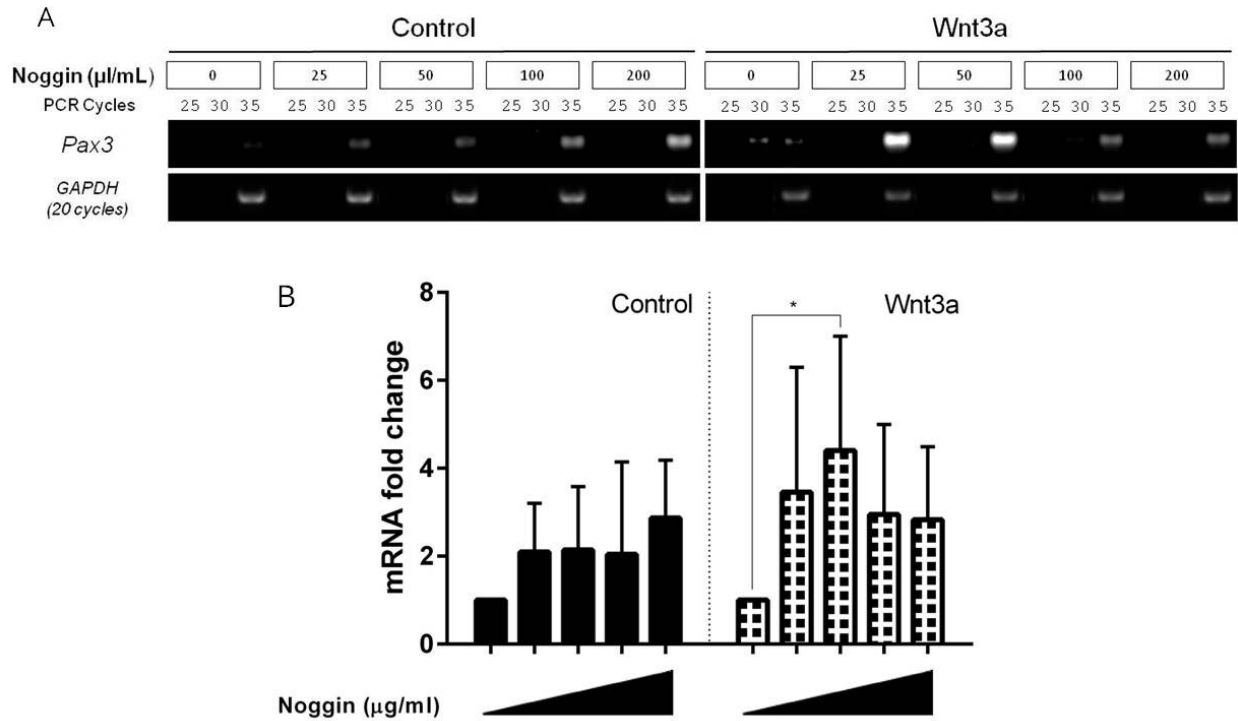


Figure 2.3 *Pax3* activity is enhanced by the BMP canonical pathway

Analyses of undifferentiated P19 cells cultured in Wnt3a-conditioned medium (Wnt3a) or control-conditioned medium (Control), treated with increasing doses of Noggin (0-200 ng/mL). (A) Representative results. After treatment, expression of *Pax3* was assessed by RT-PCR. *Gapdh* was used as a loading control. (B) Quantifications. *Pax3* expression levels were normalised against *Gapdh* expression; semi-quantitative RT-PCRs were performed approximately 24h post-transfection; results are expressed as fold change compared to the relevant absence of noggin treatment; n = 5 independent experiments performed; one-way ANOVA: ns P > 0.05; * P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001; **** P ≤ 0.0001. Error bars indicate s.e.m; *Pax3p* (*Pax3*-minimal reporter).

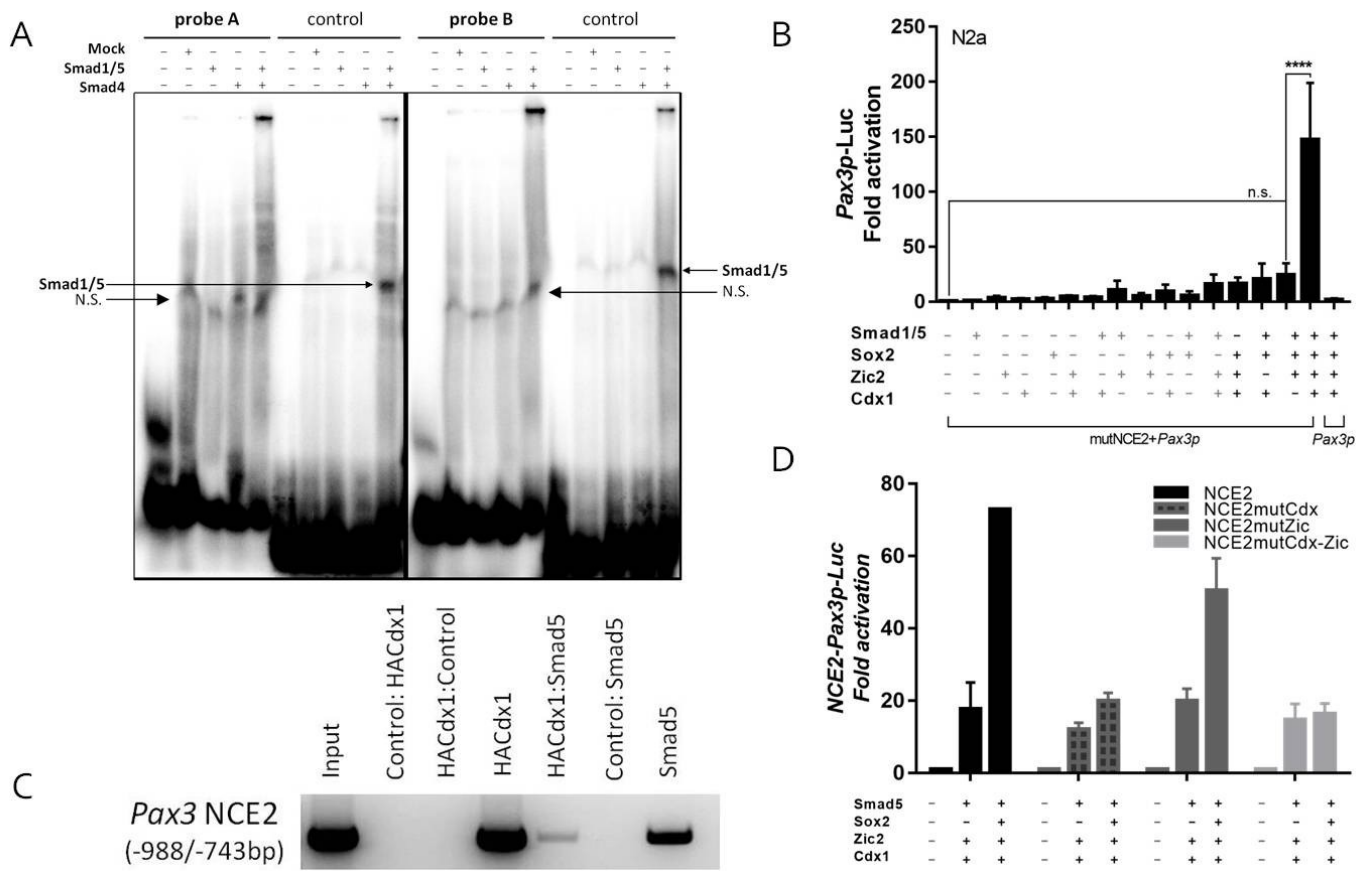


Figure 2.4 Integration of pSMAD1/5 on the Pax3NCE2 is CDX-mediated

(A) Analysis of SMAD1/5 binding to putative SmadBS1 (SBS1) and SmadBS2 (SBS2) via electrophoretic mobility shift assay (EMSA). All *in vitro* binding reactions were performed in parallel under identical conditions. Two probes containing either the SBS1 or SBS2 were incubated (+), or not (-), with nuclear extracts from Mock (cells transfected without DNA), SMAD1/5-transfected, SMAD4-transfected COS7 cells, or both. A probe containing the two consensus SmadBS present in the mouse *Id2* promoter [163] was used as a positive control. COS7 cells were treated with BMP4 in order to properly phosphorylate SMAD1/5 proteins. Note that binding of SMAD1/5 occurs on the control probes but not the two probes containing either the SBS1 or the SBS2. (B) A mutant Pax3NCE2-luciferase reporter bearing mutations in the two SmadBS was evaluated in N2a cells. Note that the co-transfection of all four proteins results in a robust transactivation of the mutPax3NCE2-luc reporter; Pax3p (Pax3-minimal reporter). (C) ChIP-ReChIP assays demonstrating specific protein complex containing both HA-CDX1 and SMAD5 on the endogenous Pax3NCE2. Anti-HA-, anti-Smad5- and anti-BFABP (control)- immunoprecipitated chromatin extracts from HA-CDX1- and SMAD5- transfected N2a cells were purified and analysed by PCR using primers flanking the Pax3NCE2 region. Note that Pax3NCE2 is amplified from chromatin samples immunoprecipitated with anti-HA (Cdx1) and anti-Smad5, but not with the non-specific IgG (anti-BLBP). Lane 5 reveals a protein interaction between CDX1-SMAD5 on the endogenous Pax3NCE2. (D) Luciferase assays in N2a cells; CdxBS are essential for the functional interaction between CDX, SMAD, ZIC and SOX. Note that the co-transfection of all four proteins results in a robust transactivation of the wt Pax3NCE2-luc reporter, and that the mutation of the CdxBS, and to a lesser extent the mutation of the ZicBS, abrogates this cooperative effect.

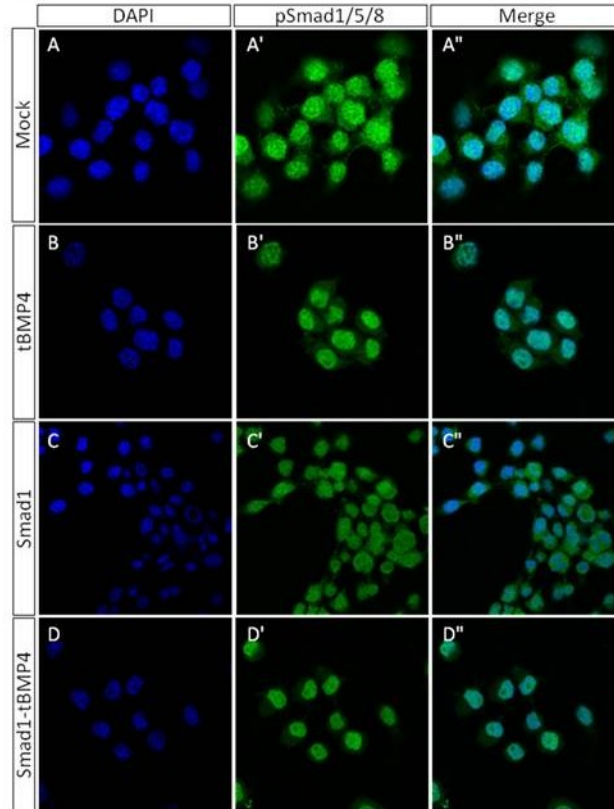


Figure 2.5 pSMAD1/5 expression pattern in N2a cells

(A) Untreated (Mock) cells. (B) Cells treated with 20ng/mL of BMP4. (C) Cells transfected with SMAD1 protein. (D) Cells treated with 20ng/mL of BMP4 and transfected with SMAD1 protein. Note that independent of treatment, pSMAD1/5 is mostly present in the nucleus of N2a, revealing the constitutively activated BMP pathway in these cells. The nucleus was marked using a DAPI antibody and distribution pattern of pSMAD1/5 was analysed using a α -pSmad1/5 antibody.

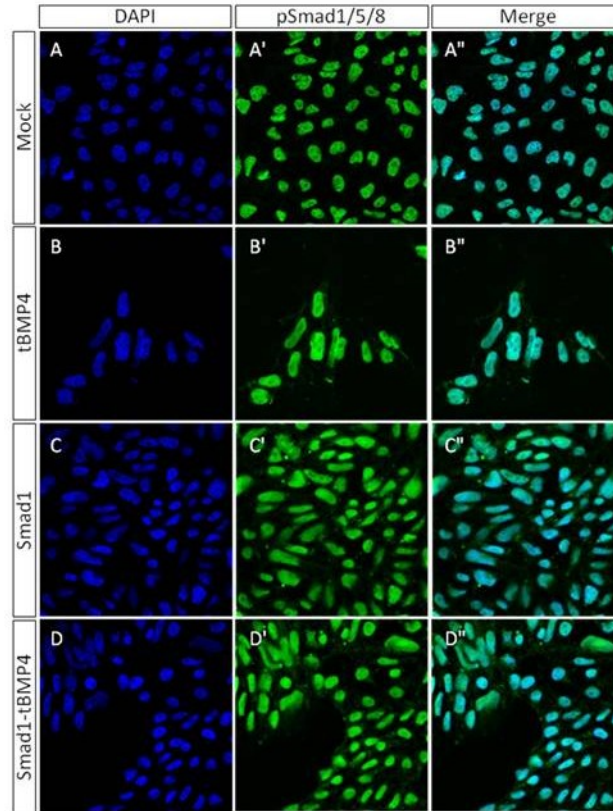


Figure 2.6 pSMAD1/5 expression pattern in P19a cells

(A) Untreated (Mock) cells. (B) Cells treated with 20ng/mL of BMP4. (C) Cells transfected with SMAD1 protein. (D) Cells treated with 20ng/mL of BMP4 and transfected with SMAD1 protein. Note that independent of treatment, pSMAD1/5 is mostly present in the nucleus of P19, revealing the constitutively activated BMP pathway in these cells. The nucleus was marked using a DAPI antibody and distribution pattern of pSMAD1/5 was analysed using a α -pSmad1/5 antibody.

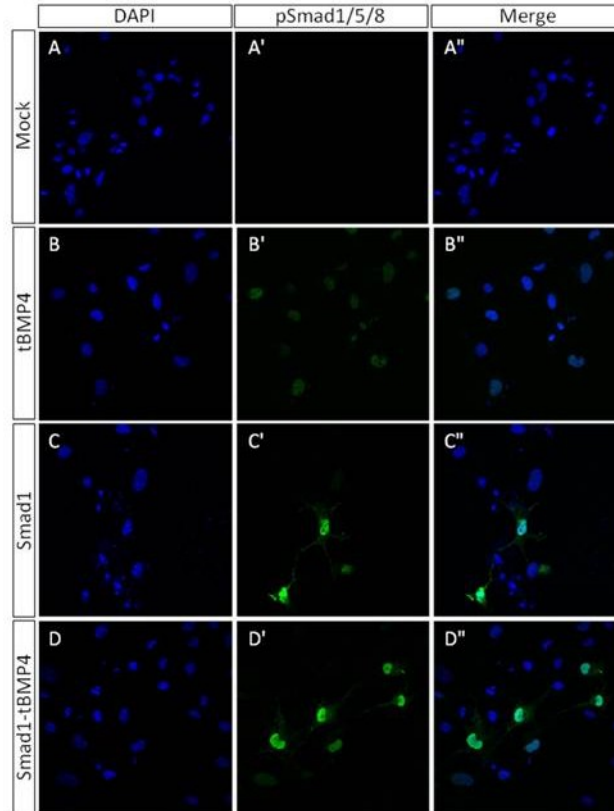


Figure 2.7 pSMAD1/5 expression pattern in COS7 cells

(A) Untreated (Mock) cells; note that no pSMAD1/5 activity is detectable in untreated cells. (B) Cells treated with 20ng/mL of BMP4; note a faint pSMAD1/5 nuclear distribution pattern in these treated cells. (C) Cells transfected with SMAD1 protein. Cells who have been transfected with SMAD1 demonstrate a strong pSMAD1/5 activity. (D) Cells treated with 20ng/mL of BMP4 and transfected with SMAD1 protein. Note that pSMAD1/5 activity is gradually increased in cells when the treatment was a transfection, or a combination of both treatments. The nucleus was marked using a DAPI antibody and distribution pattern of pSMAD1/5 was analysed using a α -pSmad1/5 antibody.

2.9. Table

Table I. Oligonucleotides used for PCR and EMSA

	Sense (5' – 3')	Antisense (5' – 3')
SmadBS1	CCTTCTCTAAGGAC <u>AGAC</u> AGTCTTTACAACACTCCTGG	CCAGGAGTGTTGTAAAGACT <u>GTCT</u> GTCCCTTAGAGAAGG
SmadBS1 mutation	CCTTCTCTAAGGAC <u>Att</u> CAGTCTTTACAACACTCCTGG	CCAGGAGTGTTGTAAAGACT <u>Gaa</u> GTCCCTTAGAGAAGG
SmadBS2	CAGCTCCTAGCCA <u>AGAC</u> GTGCTTCTTTTATTTTCCAG	CTGGAAAATAAAAAGAAGCAAC <u>GTCT</u> TGGCTAGGAGCTG
SmadBS2 mutation	CAGCTCCTAGCCA <u>Att</u> CGTTGCTTCTTTTATTTTCCAG	CTGGAAAATAAAAAGAAGCAAC <u>Gaa</u> TGGCTAGGAGCTG
Pax3NCE2	GGCACAATGGTACCTTCTCTAAGG	CCCTTCTGAGAAGCGGGGACTTTAAA
Pax3	CCTGCCAACATAACCAGCTGTCG	CTGAGGTGAAAGGCCATTGCCG
Gapdh	TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC	AGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA

* Binding sites are underlined; mutations are represented by lowercase letters

3. DISCUSSION et CONCLUSION

Comme en témoigne notre travail, l'expression du gène *Pax3* est régie par un ensemble de ECRs présents dans le promoteur proximal de 1,6 Kb de *Pax3* [145, 148]. Notre travail sur le NCE2 indique qu'il peut servir comme un bon modèle pour mieux comprendre comment les signaux instructifs AP et DV peuvent être intégrés de manière coordonnée sur un seul ECR. En effet, en plus de récapituler l'induction de l'expression de *Pax3* dans la PNP, l'expression de *Pax3* dirigée par le NCE2 est correctement restreinte [145]. Il est intéressant de noter que nous, et d'autres [133, 135, 145], avons démontré que le NCE2 semble particulièrement enrichi en sites de liaisons pour un large éventail de facteurs de transcription, y compris les membres des familles CDX, Pou de classe III, SOXB, ZIC et TEAD. Dans le but de rassembler toutes les informations provenant de ces études dans un réseau dynamique, nous avons initialement proposé un modèle dans lequel des signaux postériorisants de Wnt-CDX, en coopération avec des apports positifs de ZIC et SOXB, sont d'abord nécessaires pour induire l'expression de *Pax3* dans la PNP (Fig 3.0). Plus tard, à savoir de manière plus rostrale, l'apport répressif de la voie Shh-NKX, via la répression de ZIC2/5, est très probablement impliqué dans le maintien de la restriction dorsale de l'expression de *Pax3* [148]. Ce maintien, au niveau plus rostral, de la restriction dorsale de *Pax3*, est également très probablement assuré par l'apport positif d'autres facteurs de transcription, tels que les membres des familles Pou de classe III et TEAD [133, 135]. Bien que ce modèle proposé permette clairement de comprendre comment le NCE2 de *Pax3* est régulé par des signaux instructifs AP (Wnt-CDX), ceci était beaucoup moins clair en ce qui concerne l'intégration des signaux instructifs DV. Nos études précédentes démontraient clairement qu'un facteur inconnu était nécessaire, pendant la phase d'induction, afin de restreindre l'expression de *Pax3* aux bords latéraux de la PNP.

Plusieurs études génétiques démontrent que la voie de signalisation des BMP joue un rôle majeur dans la formation de l'axe DV lors du développement embryonnaire [5, 19-21]. L'axe DV serait spécifié par un gradient de signalisation de BMP [20, 22]. Ceci se conjuguerait à un modèle neural « par défaut » dans lequel la LP sécrèterait des antagonistes de la voie BMP qui spécifieraient le tissu neural [24, 25]. Comme il a été mentionné dans l'introduction, les études sont multiples pour démontrer la nécessité de la voie BMP dans la

formation du TN et donc dans la formation sur SNC. Puisque la NC se forme à l'interface entre les tissus médiaux et latéraux au niveau de la plaque neurale, la voie BMP a été fortement suggérée comme jouant un rôle dans l'induction de la NC. La régionalisation DV du tube neural est particulièrement importante pour la bonne spécification des neurones, des ganglions et notamment les cellules de la crête neurale. La voie BMP joue donc un rôle important dans le développement embryonnaire et dans la formation du TN. Ainsi, ce travail a permis d'en apprendre davantage sur l'intégration des signaux instructifs DV au niveau du court NCE2 de *Pax3*. Nous avons émis l'hypothèse que les protéines SMAD1/5, régulées par la signalisation par la voie BMP (BMP-SMAD1/5), joueraient un rôle important dans la régulation de l'expression de *Pax3* dans le neurectoderme caudal. Nos résultats indiquent que les protéines SMAD1/5 pourraient être le cofacteur manquant dans le contrôle CDX-dépendant de l'expression de *Pax3* via le court élément conservé NCE2, et que ces protéines (SMAD1/5) pourraient conférer le patron d'expression restreint de *Pax3* aux bordures latérales du PNP. Pour étayer cette affirmation, nous fournissons de nouvelles preuves que l'activité de BMP-SMAD1/5 sur l'expression de *Pax3* est médiée par CDX1.

Ce travail a donc démontré, via une preuve *in vitro*, le rôle des signaux instructifs DV de la voie BMP. Ainsi, le nouveau modèle présenté à la Fig 3.0 inclut ces derniers résultats et permet de mieux comprendre comment les signaux instructifs AP (Wnt-CDX) et les signaux instructifs DV (BMP-SMAD1/5) régulent ce NCE2. Bien que les expériences *in vitro* soient un passage obligé pour établir un modèle putatif de régulation des gènes, l'un des projets futurs issus de ce travail serait de démontrer ces résultats dans un contexte *in vivo*. Ceci pourrait se faire, notamment, en effectuant des immunoprécipitations sur la région caudale des embryons de souris E9,5 afin de confirmer la présence du complexe CDX1/SMAD5-*Pax3*NCE2.

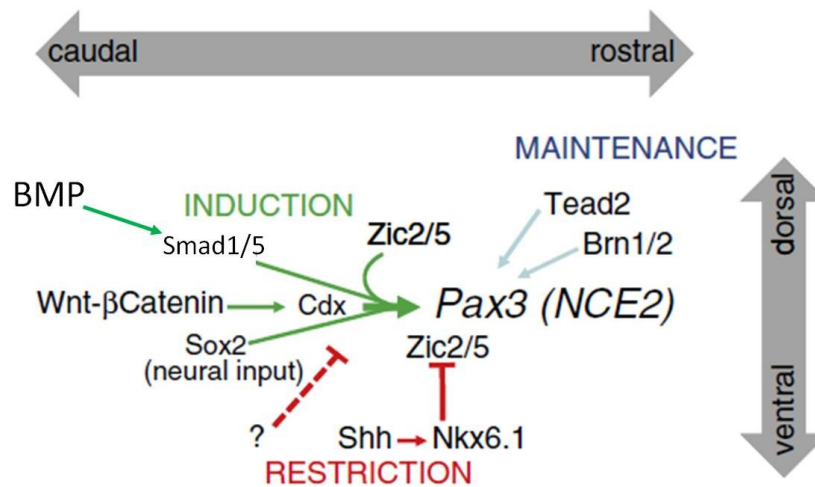


Figure 3.0 Modèle pour le contrôle de l'expression de *Pax3*, dépendant de CDX, dans le neur ectoderme caudal via le CRM NCE2.

L'induction spécifique de l'expression de *Pax3* dans PNP par des signaux postérieurisant de Wnt-Cdx, en coopération avec des apports positifs de ZIC2/5, SOX2 et SMAD1/5. Les apports positifs de SMAD1/5 sont nécessaires pour restreindre le domaine d'expression de *Pax3* aux bordures latérales de la PNP. Le maintien de l'activité restreinte de *Pax3* dans la partie dorsale du NT est très probablement médiée par ZIC2/5 qui sont les premières cibles immédiates de la voie répressive Shh-NKX6.1. Lorsque l'élongation se produit et que les apports positifs des CDX disparaissent, l'expression de *Pax3* dans le NT est très probablement maintenue par les membres des familles Pou de classe III et TEAD.

D'autres recherches ont démontré que l'expression de *Pax3* pouvait être régie par un autre ensemble d'ECRs présents dans l'intron 4 [130-133, 146]. Par contre, l'étude des ECRs dans l'intron 4 n'a pas encore été approfondie par une technique de ciblage de gènes et donc l'exigence des ECRs présents dans cet intron n'est pas encore connue. Toutefois, la suppression des ECRs à l'extrémité 5' dans la souris a démontré une redondance fonctionnelle entre ces deux ensembles régulateurs [132]. Il est intéressant de noter que, bien qu'on s'attende que chaque ensemble d'ECRs réponde aux mêmes signaux AP et DV, différents mécanismes semblent être utilisés (par exemple *Shh-Nkx6.1-Pax3* vs *Shh-Nkx6.1-Zic2-Pax3*). Ainsi, un futur projet de recherche (potentiel) permettrait de savoir si les facteurs qui régulent l'induction de *Pax3* au niveau du NCE2 sont les mêmes au niveau de l'intron 4. De plus, des études mécanistiques effectuées dans ce laboratoire de recherche ont révélé que l'expression de *Msx1* et *FoxD3* était directement régulée par les CDX par un même mode de fonctionnement que pour *Pax3*, soit par la liaison directe des CDX à des éléments conservés au sein de la région du promoteur proximal [173]. Il serait donc aussi intéressant d'étudier

l'apport des signaux instructifs DV (BMP-SMAD) sur l'expression de ces autres spécificateurs de la NC et de déterminer si la même combinaison, ou une combinaison similaire, de signaux instructifs AP et DV régulent leur expression. Ceci pourrait se faire, notamment, en reprenant les expériences effectuées au cours de cette recherche. Ainsi, on pourrait évaluer l'induction de l'expression endogène de *Msx1* et *FoxD3* en traitement des cellules P19 non différenciées en présence ou absence de Wnt3a et de Noggin. Comme les promoteurs de *Msx1* et *FoxD3* contiennent déjà des sites de liaison pour les CDX, des études de CHIP et de re-CHIP pourraient être utiles pour évaluer la présence du complexe CDX1/SMAD5 à leurs promoteurs respectifs dans la région caudale. Des essais luciférase pourraient aussi être utilisés afin d'évaluer si, comme pour *Pax3*, la présence de SMAD1/5 permettrait d'induire l'expression de ces gènes dans des cellules P19 non différenciées. De plus, comme il est connu que *FoxD3* est régulé par des enhancers différents spécifiques à des niveaux axiaux distincts dans les embryons de poulet, et que ces enhancers peuvent être activés par différents signaux [33, 47-52], il serait intéressant d'effectuer ces expériences en parallèle sur ces différents enhancers afin de voir si cela est aussi vrai chez la souris.

Comme certaines recherches [53, 75] effectuées sur les embryons de poulet émettent l'hypothèse que la séquence temporelle de la signalisation est importante et que l'induction de la NC requiert en premier des signaux Wnt, suivi d'une signalisation par BMP, elle-même régulée par des signaux Wnt, il serait judicieux d'étudier si cette même temporalité est présente chez la souris. Le modèle que nous proposons pour la régulation du NCE2 de *Pax3* n'exclut pas la possibilité qu'une séquence temporelle régule l'induction de ce gène et donc des recherches additionnelles permettront potentiellement de vérifier si ce mécanisme d'induction est conservé entre ces espèces. Ceci pourrait se faire de manière *in vitro* ou *ex vivo*. Nos recherches précédentes ont démontré que l'expression de *Pax3* pouvait être induite dans les P19 non différenciées lorsque ces dernières sont traitées pendant 18h avec Wnt3a [145]. Une approche possible serait donc de cultiver les P19 dans le milieu conditionné Wnt3a et d'ajouter du Noggin à des intervalles spécifiques afin de déterminer si une séquence temporelle de signalisation est significative pour l'induction de l'expression de *Pax3*. De manière *ex vivo*, une étude similaire à celle effectuée sur les embryons de poulet [75], mentionnée ci-haut, pourrait être faite. Ainsi, des explants d'embryons de souris à différents stades de développement au niveau caudal (stade préliminaire et tardif de la gastrulation et

pendant la neurulation), pourraient être mis en culture et traités avec les ligands des voies Wnt et BMP, ainsi qu'avec leurs antagonistes. À l'aide de différents marqueurs cellulaires, notamment *Pax3*, il serait possible de voir quelle combinaison spatio-temporelle de Wnt et BMP induit des cellules à caractère crête neurale, ainsi que des cellules à caractère neural, épidermal et placodal. De plus, des analyses ChIP sur des embryons de souris à différents stades de développement au niveau caudal (stade préliminaire et tardif de la gastrulation et pendant la neurulation) afin de confirmer la présence du complexe CDX1/SMAD5-*Pax3*NCE2 de manière spatio-temporelle.

L'avancement des recherches faites sur la CN dans plusieurs systèmes modèles, incluant les embryons de grenouille, de poisson-zèbre et de poulet, montrent parfois des exigences comparables dans les gènes spécifiques nécessaires pour les premières étapes du développement de la NC. Toutefois, les gènes homologues chez la souris ne présentent parfois pas des exigences comparables. Bien que les souris se révèlent être de meilleurs modèles pour l'étude du développement humain et des neurocristopathies associées, on ne sait pas encore si ces différences sont des différences fondamentales ou non entre les mammifères et les non mammifères. Les résultats préliminaires présentés ici contribuent à combler le fossé entre la souris et le poulet en ce qui a trait à l'induction de la NC [53, 75], en plus de soutenir un modèle retrouvé dans les embryons de grenouille, de poisson-zèbre et de poulet [71, 92-94] dans lequel des niveaux intermédiaires de BMP sont nécessaires pour cette induction. Toutefois, l'étude de la CN en utilisant d'autres espèces de mammifères est nécessaire afin de préciser le degré de conservation des résultats obtenus par notre recherche dans la lignée des mammifères. De plus, des expériences ont démontré la nécessité d'autres voies de signalisation, notamment FGF, dans l'induction de la CN. Ainsi, il a été démontré que la voie FGF est nécessaire pendant la gastrulation dans les embryons de poisson-zèbre pour induire l'expression de *Pax3* au niveau des NPB [71]. Ainsi, il serait judicieux d'étudier la régulation de l'expression de *Pax3* par les voies FGF-CDX, ainsi que par les voies AR-CDX, afin de voir comment sont intégrées ces voies au niveau du NCE2 de *Pax3*.

Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires qui contrôlent le CN-GRN est nécessaire afin d'obtenir une meilleure compréhension du contrôle des programmes de

différenciations cellulaires, et surtout, afin de pouvoir éventuellement développer des outils permettant d'améliorer le dépistage, le diagnostic ou le traitement précoce de maladies liées aux défauts du développement précoce du système nerveux.

4. RÉFÉRENCES

1. Kojima, Y., O.H. Tam, and P.P. Tam, *Timing of developmental events in the early mouse embryo*. *Semin Cell Dev Biol*, 2014. **34**: p. 65-75.
2. Tam, P.P.L. and R.R. Behringer, *Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan*. *Mechanisms of Development*, 1997. **68**(1-2): p. 3-25.
3. Rivera-Pérez, J.A. and A.K. Hadjantonakis, *The Dynamics of Morphogenesis in the Early Mouse Embryo*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. **7**(11): p. 1-17.
4. Sutherland, A.E., *Tissue morphodynamics shaping the early mouse embryo*. *Semin Cell Dev Biol*, 2016. **55**: p. 89-98.
5. Winnier, G., et al., *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. *Genes Dev*, 1995. **9**(17): p. 2105-16.
6. Ben-Haim, N., et al., *The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4*. *Dev Cell*, 2006. **11**(3): p. 313-23.
7. Arnold, S.J. and E.J. Robertson, *Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(2): p. 91-103.
8. Kinder, S.J., et al., *The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm*. *Development*, 2001. **128**(18): p. 3623-3634.
9. Copp, A.J., N.D. Greene, and J.N. Murdoch, *The genetic basis of mammalian neurulation*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(10): p. 784-93.
10. Greene, N.D. and A.J. Copp, *Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube*. *Prenat Diagn*, 2009. **29**(4): p. 303-11.
11. Simoes-Costa, M. and M.E. Bronner, *Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe*. *Development*, 2015. **142**(2): p. 242-57.
12. Copp, A.J. and N.D. Greene, *Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013. **2**(2): p. 213-27.
13. Greene, N.D. and A.J. Copp, *Neural tube defects*. *Annu Rev Neurosci*, 2014. **37**: p. 221-42.
14. Rossant, J. and P.P. Tam, *Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development*. *Dev Cell*, 2004. **7**(2): p. 155-64.
15. Srinivas, S., et al., *Active cell migration drives the unilateral movements of the anterior visceral endoderm*. *Development*, 2004. **131**(5): p. 1157-64.
16. Rivera-Pérez, J.A., J. Mager, and T. Magnuson, *Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm*. *Developmental Biology*, 2003. **261**(2): p. 470-487.
17. Rossant, J. and P.P. Tam, *Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse*. *Development*, 2009. **136**(5): p. 701-13.
18. Beddington, R.S.P. and E.J. Robertson, *Axis Development and Early Asymmetry in Mammals*. *Cell*, 1999. **96**(2): p. 195-209.
19. Bachiller, D., et al., *The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development*. *Nature*, 2000. **403**(6770): p. 658-61.

20. De Robertis, E.M. and H. Kuroda, *Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 285-308.
21. Mishina, Y., et al., *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis*. *Genes Dev*, 1995. **9**(24): p. 3027-37.
22. Tucker, J.A., K.A. Mintzer, and M.C. Mullins, *The BMP signaling gradient patterns dorsoventral tissues in a temporally progressive manner along the anteroposterior axis*. *Dev Cell*, 2008. **14**(1): p. 108-19.
23. Eivers, E., L.C. Fuentealba, and E.M. De Robertis, *Integrating positional information at the level of Smad1/5/8*. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(4): p. 304-10.
24. Levine, A.J. and A.H. Brivanlou, *Proposal of a model of mammalian neural induction*. *Dev Biol*, 2007. **308**(2): p. 247-56.
25. Munoz-Sanjuan, I. and A.H. Brivanlou, *Neural induction, the default model and embryonic stem cells*. *Nat Rev Neurosci*, 2002. **3**(4): p. 271-80.
26. Davis, S., et al., *BMP receptor IA is required in the mammalian embryo for endodermal morphogenesis and ectodermal patterning*. *Dev Biol*, 2004. **270**(1): p. 47-63.
27. Ybot-Gonzalez, P., et al., *Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling*. *Development*, 2007. **134**(17): p. 3203-3211.
28. Juriloff, D.M. and M.J. Harris, *A consideration of the evidence that genetic defects in planar cell polarity contribute to the etiology of human neural tube defects*. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2012. **94**(10): p. 824-840.
29. Ybot-Gonzalez, P., et al., *Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure*. *Development*, 2002. **129**(10): p. 2507-17.
30. Echelard, Y., et al., *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity*. *Cell*, 1993. **75**(7): p. 1417-30.
31. Goodrich, L.V., et al., *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants*. *Science*, 1997. **277**(5329): p. 1109-13.
32. Taneyhill, L.A. and M. Bronner-Fraser, *Dynamic alterations in gene expression after Wnt-mediated induction of avian neural crest*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(11): p. 5283-93.
33. Green, S.A., M. Simoes-Costa, and M.E. Bronner, *Evolution of vertebrates as viewed from the crest*. *Nature*, 2015. **520**(7548): p. 474-82.
34. Stuhlmiller, T.J. and M.I. Garcia-Castro, *Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(22): p. 3715-37.
35. Sauka-Spengler, T. and M. Bronner-Fraser, *A gene regulatory network orchestrates neural crest formation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(7): p. 557-68.
36. Hall, B.K., *The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic*. *Evol Dev*, 2000. **2**(1): p. 3-5.
37. Sauka-Spengler, T. and M. Bronner, *Snapshot: neural crest*. *Cell*, 2010. **143**(3): p. 486-486 e1.

38. Sauka-Spengler, T. and M. Bronner-Fraser, *Development and evolution of the migratory neural crest: a gene regulatory perspective*. *Curr Opin Genet Dev*, 2006. **16**(4): p. 360-6.
39. Bronner, M.E. and N.M. LeDouarin, *Development and evolution of the neural crest: an overview*. *Dev Biol*, 2012. **366**(1): p. 2-9.
40. Meulemans, D. and M. Bronner-Fraser, *Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development*. *Dev Cell*, 2004. **7**(3): p. 291-9.
41. Erickson, C.A. and J.A. Weston, *An SEM analysis of neural crest migration in the mouse*. *J Embryol Exp Morphol*, 1983. **74**: p. 97-118.
42. Le Lievre, C.S., et al., *Restrictions of developmental capabilities in neural crest cell derivatives as tested by in vivo transplantation experiments*. *Dev Biol*, 1980. **77**(2): p. 362-378.
43. LeDouarin, N.M. and M.-A.M. Teillet, *Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique*. *Dev Biol*, 1974. **41**(1): p. 162-184.
44. LeDouarin, N., *The Neural Crest*. 1982, Cambridge: Cambridge University Press.
45. Calloni, G.W., et al., *Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(50): p. 19879-84.
46. McGonnell, I.M. and A. Graham, *Trunk Neural Crest Has Skeletogenic Potential*. *Curr Biol*, 2002. **12**(9): p. 767-71.
47. Simoes-Costa, M. and M.E. Bronner, *Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis*. *Genome Res*, 2013. **23**(7): p. 1069-80.
48. Betancur, P., M. Bronner-Fraser, and T. Sauka-Spengler, *Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010. **26**: p. 581-603.
49. Simoes-Costa, M.S., et al., *Dynamic and differential regulation of stem cell factor FoxD3 in the neural crest is Encrypted in the genome*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(12): p. e1003142.
50. Fossat, N., et al., *Modulation of WNT signaling activity is key to the formation of the embryonic head*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(1): p. 26-32.
51. Simoes-Costa, M. and M.E. Bronner, *Reprogramming of avian neural crest axial identity and cell fate*. *Science*, 2016. **352**(6293): p. 1570-3.
52. Cheung, M., et al., *The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination*. *Dev Cell*, 2005. **8**(2): p. 179-92.
53. Patthey, C. and L. Gunhaga, *Signaling pathways regulating ectodermal cell fate choices*. *Exp Cell Res*, 2014. **321**(1): p. 11-6.
54. van Amerongen, R. and A. Berns, *Knockout mouse models to study Wnt signal transduction*. *Trends Genet*, 2006. **22**(12): p. 678-89.
55. Libro, R., P. Bramanti, and E. Mazzon, *The role of the wnt canonical signaling in neurodegenerative diseases*. *Life Sci*, 2016.
56. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. **149**(6): p. 1192-205.
57. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(32): p. 22429-33.

58. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. **4**(2): p. 68-75.
59. Lewis, S.L., et al., *Dkk1 and Wnt3 interact to control head morphogenesis in the mouse*. Development, 2008. **135**(10): p. 1791-801.
60. Nordstrom, U., T.M. Jessell, and T. Edlund, *Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling*. Nat Neurosci, 2002. **5**(6): p. 525-32.
61. Liu, P., et al., *Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 361-5.
62. Huelsken, J., et al., *Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice*. J Cell Biol, 2000. **7**(148): p. 567-78.
63. Takada, S., et al., *Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo*. Genes Dev, 1994. **8**(2): p. 174-89.
64. Greco, T.L., et al., *Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development*. Genes Dev, 1996. **10**(3): p. 313-24.
65. Monsoro-Burq, A.H., E. Wang, and R. Harland, *Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during Xenopus neural crest induction*. Dev Cell, 2005. **8**(2): p. 167-78.
66. Steventon, B., et al., *Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction*. Development, 2009. **136**(5): p. 771-9.
67. Lewis, J.L., et al., *Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development*. Development, 2004. **131**(6): p. 1299-308.
68. Bang, A.G., et al., *Expression of Pax-3 in the Lateral Neural Plate Is Dependent on a Wnt-Mediated Signal from Posterior Nonaxial Mesoderm*. Dev Biol, 1999. **212**(2): p. 366-380.
69. Saint-Jeannet, J.P., et al., *Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13713-8.
70. Bang, A.G., et al., *Expression of Pax-3 is initiated in the early neural plate by posteriorizing signals produced by the organizer and by posterior non-axial mesoderm*. Development, 1997. **124**(10): p. 2075-85.
71. Garnett, A.T., T.A. Square, and D.M. Medeiros, *BMP, Wnt and FGF signals are integrated through evolutionarily conserved enhancers to achieve robust expression of Pax3 and Zic genes at the zebrafish neural plate border*. Development, 2012. **139**(22): p. 4220-31.
72. Ikeya, M., et al., *Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors*. Nature, 1997. **389**(6654): p. 966-70.
73. Parr, B.A., et al., *Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds*. Development, 1993. **119**(1): p. 247-61.
74. Yoshikawa, Y., et al., *Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse*. Dev Biol, 1997. **183**(2): p. 234-42.
75. Patthey, C., T. Edlund, and L. Gunhaga, *Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate*. Development, 2009. **136**(1): p. 73-83.

76. Patthey, C., L. Gunhaga, and T. Edlund, *Early development of the central and peripheral nervous systems is coordinated by Wnt and BMP signals*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1625.
77. Carmona-Fontaine, C., et al., *Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm*. Dev Biol, 2007. **309**(2): p. 208-21.
78. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005. **16**(3): p. 251-63.
79. Katagiri, T. and T. Watabe, *Bone Morphogenetic Proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. **8**(6).
80. Le Dréau, G. and E. Martí, *The multiple activities of BMPs during spinal cord development*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(22): p. 4293-4305.
81. Kishigami, S. and Y. Mishina, *BMP signaling and early embryonic patterning*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(3): p. 265-78.
82. Mishina, Y., et al., *Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis*. Development, 1999. **1999**(213): p. 2.
83. Gu, Z., et al., *The type I serine/threonine kinase receptor ActRIA (ALK2) is required for gastrulation of the mouse embryo*. Development, 1999. **126**(11): p. 2551-61.
84. Beppu, H., et al., *BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos*. Dev Biol, 2000. **221**(1): p. 249-58.
85. Fujiwara, T., et al., *Distinct requirements for extra-embryonic and embryonic bone morphogenetic protein 4 in the formation of the node and primitive streak and coordination of left-right asymmetry in the mouse*. Development, 2002. **129**(20): p. 4685-96.
86. Bandyopadhyay, A., P.S. Yadav, and P. Prashar, *BMP signaling in development and diseases: A pharmacological perspective*. Biochemical Pharmacology, 2013. **85**(7): p. 857-864.
87. Warren, S.M., et al., *The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion*. Nature, 2003. **422**(6932): p. 625-9.
88. McMahon, J.A., et al., *Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1438-52.
89. Eom, D.S., et al., *Bone morphogenetic proteins regulate neural tube closure by interacting with the apicobasal polarity pathway*. Development, 2011. **138**(15): p. 3179-88.
90. Solloway, M.J. and E.J. Robertson, *Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup*. Development, 1999. **126**(8): p. 1753-68.
91. Marchant, L., et al., *The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient*. Dev Biol, 1998. **198**(2): p. 319-329.
92. Tribulo, C., et al., *Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification*. Development, 2003. **130**(26): p. 6441-52.
93. Nguyen, V.H., et al., *Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a bmp2b/swirl pathway of genes*. Dev Biol, 1998. **199**(1): p. 93-110.

94. Schumacher, J.A., et al., *An intermediate level of BMP signaling directly specifies cranial neural crest progenitor cells in zebrafish*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27403.
95. Ragland, J.W. and D.W. Raible, *Signals derived from the underlying mesoderm are dispensable for zebrafish neural crest induction*. Dev Biol, 2004. **276**(1): p. 16-30.
96. Sjodal, M., T. Edlund, and L. Gunhaga, *Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes ex vivo*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 141-9.
97. Karel F. Liem, J., Gabi Tremml, and a.T.M.J. Henk Roelink, *Dorsal Differentiation of Neural Plate Cells Induced by BMP-Mediated Signals from Epidermal Ectoderm*. Cell, 1995. **82**: p. 969-979.
98. Anderson, R.M., et al., *Endogenous bone morphogenetic protein antagonists regulate mammalian neural crest generation and survival*. Developmental Dynamics, 2006. **235**(9): p. 2507-2520.
99. Stottmann, R.W. and J. Klingensmith, *Bone morphogenetic protein signaling is required in the dorsal neural folds before neurulation for the induction of spinal neural crest cells and dorsal neurons*. Dev Dyn, 2011. **240**(4): p. 755-65.
100. Li, J., et al., *Transgenic rescue of congenital heart disease and spina bifida in Splotch mice*. Development, 1999. **126**(11): p. 2495-503.
101. Copp, A.J., P. Stanier, and N.D. Greene, *Neural tube defects: recent advances, unsolved questions, and controversies*. Lancet Neurol, 2013. **12**(8): p. 799-810.
102. Monsoro-Burq, A.H., *PAX transcription factors in neural crest development*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **44**: p. 87-96.
103. Holland, L.Z., et al., *AmphiPax3/7, an amphioxus paired box gene: insights into chordate myogenesis, neurogenesis, and the possible evolutionary precursor of definitive vertebrate neural crest*. Evol Dev, 1999. **1**(3): p. 153-65.
104. Chi, N. and J.A. Epstein, *Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease*. Trends Genet, 2002. **18**(1): p. 41-7.
105. Goulding, M.D., et al., *Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis*. EMBO J, 1991. **10**(5): p. 1135-47.
106. Nelms, B.L. and P.A. Labosky, *Transcriptional Control of Neural Crest Development*. Developmental Biology, ed. D.S. Kessler. 2010, San Rafael, CA: Morgan & Claypool Life Sciences. 227.
107. Mansouri, A., et al., *Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice*. Development, 1996. **122**(3): p. 831-8.
108. Basch, M.L., M. Bronner-Fraser, and M.I. Garcia-Castro, *Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 218-22.
109. Serbedzija, G.N. and A.P. McMahon, *Analysis of neural crest cell migration in Splotch mice using a neural crest-specific LacZ reporter*. Dev Biol, 1997. **185**(2): p. 139-47.
110. Mansouri, A. and P. Gruss, *Pax3 and Pax7 are expressed in commissural neurons and restrict ventral neuronal identity in the spinal cord*. Mech Dev, 1998. **78**(1-2): p. 171-8.
111. Tremblay, P., F. Pituello, and P. Gruss, *Inhibition of floor plate differentiation by Pax3: evidence from ectopic expression in transgenic mice*. Development, 1996. **122**(8): p. 2555-67.

112. Russell, L., *Splotch, a new mutation in the house mouse Mus musculus*. Genetics, 1947. **107**.
113. Auerbach, R., *Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse*. J Exp Zool, 1954. **127**: p. 305-29.
114. Epstein, D.J., M. Vekemans, and P. Gros, *Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3*. Cell, 1991. **67**(4): p. 767-74.
115. Zhou, H.M., et al., *Lineage-specific responses to reduced embryonic Pax3 expression levels*. Dev Biol, 2008. **315**(2): p. 369-82.
116. Engleka, K.A., et al., *Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives*. Dev Biol, 2005. **280**(2): p. 396-406.
117. Mansouri, A., et al., *Pax3 acts cell autonomously in the neural tube and somites by controlling cell surface properties*. Development, 2001. **128**(11): p. 1995-2005.
118. Greene, N.D., V. Massa, and A.J. Copp, *Understanding the causes and prevention of neural tube defects: Insights from the splotch mouse model*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2009. **85**(4): p. 322-30.
119. Epstein, D.J., *Pax3, neural crest and cardiovascular development*. Trends Cardiovasc Med, 1996. **6**(8): p. 255-60.
120. Wu, M., et al., *Persistent expression of Pax3 in the neural crest causes cleft palate and defective osteogenesis in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2076-87.
121. Barber, T.D., et al., *PAX3 gene structure, alternative splicing and evolution*. Gene, 1999. **237**(2): p. 311-9.
122. Epstein, D.J., et al., *A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 532-6.
123. Pingault, V., et al., *Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome*. Hum Mutat, 2010. **31**(4): p. 391-406.
124. Milet, C. and A.H. Monsoro-Burq, *Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates*. Dev Biol, 2012. **366**(1): p. 22-33.
125. Plouhinec, J.L., et al., *Pax3 and Zic1 trigger the early neural crest gene regulatory network by the direct activation of multiple key neural crest specifiers*. Dev Biol, 2014. **386**(2): p. 461-72.
126. Sato, T., N. Sasai, and Y. Sasai, *Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in Xenopus ectoderm*. Development, 2005. **132**(10): p. 2355-63.
127. Maretto, S., et al., *Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3299-304.
128. Tozer, S., et al., *Temporal control of BMP signalling determines neuronal subtype identity in the dorsal neural tube*. Development, 2013. **140**(7): p. 1467-74.
129. Yang, Y.P. and J. Klingensmith, *Roles of organizer factors and BMP antagonism in mammalian forebrain establishment*. Dev Biol, 2006. **296**(2): p. 458-75.
130. Moore, S., et al., *Distinct regulatory mechanisms act to establish and maintain Pax3 expression in the developing neural tube*. PLoS Genet, 2013. **9**(10): p. e1003811.
131. Thomas A. Natoli, M.K.E., Chuanzhen Wu, Kenneth W. Gross and Steven Pruitt, *Positive and negative DNA sequence elements are required to establish the pattern of Pax3 expression*. Development, 1997. **124**(3): p. 617-626.

132. Degenhardt, K.R., et al., *Distinct enhancers at the Pax3 locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions*. Dev Biol, 2010. **339**(2): p. 519-27.
133. Milewski, R.C., et al., *Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3*. Development, 2004. **131**(4): p. 829-37.
134. Chang, C.P., et al., *Pbx1 functions in distinct regulatory networks to pattern the great arteries and cardiac outflow tract*. Development, 2008. **135**(21): p. 3577-86.
135. Pruitt, S.C., et al., *Hox/Pbx and Brn binding sites mediate Pax3 expression in vitro and in vivo*. Gene Expr Patterns, 2004. **4**(6): p. 671-85.
136. Gaunt, S.J., D. Drage, and R.C. Trubshaw, *cdx4/lacZ and cdx2/lacZ protein gradients formed by decay during gastrulation in the mouse*. Int J Dev Biol, 2005. **49**(8): p. 901-8.
137. Gaunt, S.J., D. Drage, and A. Cockley, *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*. Mechanisms of Development, 2003. **120**(5): p. 573-586.
138. Subramanian, V., B.I. Meyer, and P. Gruss, *Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes*. Cell, 1995. **83**(4): p. 641-53.
139. Chawengsaksophak, K., et al., *Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7641-5.
140. van de Ven, C., et al., *Concerted involvement of Cdx/Hox genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone*. Development, 2011. **138**(16): p. 3451-62.
141. Savory, J.G., et al., *Cdx1 and Cdx2 are functionally equivalent in vertebral patterning*. Dev Biol, 2009. **330**(1): p. 114-22.
142. Lohnes, D., *The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse*. Bioessays, 2003. **25**(10): p. 971-80.
143. Pilon, N., et al., *Cdx4 is a direct target of the canonical Wnt pathway*. Developmental Biology, 2006. **289**(1): p. 55-63.
144. Pilon, N., et al., *Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo*. Development, 2007. **134**(12): p. 2315-23.
145. Sanchez-Ferras, O., et al., *Caudal-related homeobox (Cdx) protein-dependent integration of canonical Wnt signaling on paired-box 3 (Pax3) neural crest enhancer*. J Biol Chem, 2012. **287**(20): p. 16623-35.
146. Zhao, T., et al., *beta-catenin regulates Pax3 and Cdx2 for caudal neural tube closure and elongation*. Development, 2014. **141**(1): p. 148-57.
147. Pinson, K., et al., *An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice*. Nature, 2000. **407**(6803): p. 535-8.
148. Sanchez-Ferras, O., et al., *Induction and dorsal restriction of Paired-box 3 (Pax3) gene expression in the caudal neuroectoderm is mediated by integration of multiple pathways on a short neural crest enhancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1839**(7): p. 546-58.
149. Fuentealba, L.C., et al., *Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal*. Cell, 2007. **131**(5): p. 980-993.

150. Mari, L., et al., *A pSMAD/CDX2 Complex Is Essential for the Intestinalization of Epithelial Metaplasia*. Cell Reports, 2014. **7**(4): p. 1197-1210.
151. Barros, R., et al., *Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines*. J Pathol, 2008. **215**(4): p. 411-20.
152. Lengerke, C., et al., *BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(1): p. 72-82.
153. Hussein, S.M., E.K. Duff, and C. Sirard, *Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48805-14.
154. Barriga, E.H., et al., *Animal models for studying neural crest development: is the mouse different?* Development, 2015. **142**(9): p. 1555-60.
155. <Gruenbaum - The female circumcision controversy an anthropological perspective.pdf>.
156. Ross, C.T., et al., *The Origins and Maintenance of Female Genital Modification across Africa : Bayesian Phylogenetic Modeling of Cultural Evolution under the Influence of Selection*. Hum Nat, 2016. **27**(2): p. 173-200.
157. Villanueva, S., et al., *Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction*. Dev Biol, 2002. **241**(2): p. 289-301.
158. Pasero, M., et al., *Bone morphogenetic protein/SMAD signaling orients cell fate decision by impairing KSRP-dependent microRNA maturation*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1159-68.
159. Koyabu, Y., et al., *Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6889-92.
160. Bani-Yaghub, M., et al., *Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex*. Dev Biol, 2006. **295**(1): p. 52-66.
161. Furlan-Magaril, M., H. Rincon-Arano, and F. Recillas-Targa, *Sequential chromatin immunoprecipitation protocol: ChIP-reChIP*. Methods Mol Biol, 2009. **543**: p. 253-66.
162. Berube-Simard, F.A., C. Prudhomme, and L. Jeannotte, *YY1 acts as a transcriptional activator of Hoxa5 gene expression in mouse organogenesis*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93989.
163. Nakahiro, T., et al., *Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(3): p. 416-21.
164. Henningfeld, K.A., et al., *Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21827-35.
165. Katagiri, T., et al., *Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis*. Genes Cells, 2002. **7**(9): p. 949-60.
166. Korchynskiy, O. and P. ten Dijke, *Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **277**(7): p. 4883-4891.
167. Lopez-Rovira, T., et al., *Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3176-85.
168. Petropoulos, H. and I.S. Skerjanc, *Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15393-9.

169. Colombres, M., et al., *Heparin activates Wnt signaling for neuronal morphogenesis*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 805-15.
170. Shi, F., et al., *Beta-catenin up-regulates Atoh1 expression in neural progenitor cells by interaction with an Atoh1 3' enhancer*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 392-400.
171. Shibamoto, S., et al., *Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling*. Genes Cells, 1998. **3**(10): p. 659-70.
172. Zaret, K.S. and J.S. Carroll, *Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression*. Genes Dev, 2011. **25**(21): p. 2227-41.
173. Sanchez-Ferras, O., et al., *A direct role for murine Cdx proteins in the trunk neural crest gene regulatory network*. Development, 2016. **143**(8): p. 1363-74.