

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

GÉNÉRATION D'UN NOUVEL OUTIL POUR L'ÉTUDE *IN VIVO*
DE LA NEUROGENÈSE ET CARACTÉRISATION
DE LA RÉGULATION ET DES FONCTIONS NEURALES
DES PROTÉINES CDX

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
BAPTISTE COUTAUD

OCTOBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [a] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

L'ensemble de ces travaux a été financé par les fonds de recherche des Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et par une bourse d'excellence des cycles supérieurs de l'UQAM (FARE).

Je tiens à remercier le docteur Nicolas Pilon pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire.

Je remercie mes collègues de laboratoire ainsi que les personnes du département côtoyés durant ma scolarité à l'UQAM pour leur soutien et leur bonne humeur.

Je souhaite également remercier ma compagne, ma famille et mes amis pour m'avoir supporté, conseillé, encouragé et parfois motivé à persévérer jusqu'au bout pour finir mon cursus universitaire.

TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGNES ET ACRONYMES.....	ix
RESUME.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ETAT DES CONNAISSANCES.....	3
1.1 Embryogenèse et développement du neuroectoderme.....	3
1.2 Défauts de développement et maladies associées.....	8
1.3 Voies de signalisation.....	8
1.4 Régulation génétique et technologie Cre-LoxP.....	18
1.5 Protéines Cdx	22
CHAPITRE II	
HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS.....	29
2.1 Hypothèses de travail.....	29
2.2 Objectifs de la thèse.....	29
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
3.1 Clonage des constructions <i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc et NCE3-Pax3p-Luc	31
3.2 Culture et transfection cellulaire.....	32
3.3 Essais luciférase.....	33
3.4 Ecart type et tests statistiques.....	34

CHAPITRE IV	
GÉNÉRATION D'UN NOUVEAU MODÈLE <i>IN VIVO</i> POUR	
EXPRESSION CONDITIONNELLE DANS LE	
NEUROECTODERME CAUDAL.....	
	35
4.1	Abstract.....
	36
4.2	Introduction.....
	37
4.3	Results and discussion.....
	39
4.4	Materials and methods.....
	42
4.5	References.....
	44
4.6	Acknowledgements.....
	46
4.7	Figure legends.....
	47
4.8	Figures.....
	49
CHAPITRE V	
RÉGULATION DE L'EXPRESSION NEURALE DE <i>CDX2</i> VIA SON	
ENHANCER INTRONIQUE <i>CDX2NSE</i>	
	55
5.1	Mise en place de l'expérience.....
	55
5.2	Effets de la voie FGF.....
	57
5.3	Effets de la voie BMP.....
	59
5.4	Effets de la voie Wnt canonique.....
	61
CHAPITRE VI	
RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>PAX3</i> PAR LES PROTÉINES	
<i>CDX</i> VIA SON ENHANCER INTRONIQUE <i>NCE3</i>	
	65
6.1	Mise en place de l'expérience.....
	65
6.2	Effets des protéines Cdx.....
	66
CHAPITRE VII	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	
	69
7.1	Caractérisation d'un système d'expression conditionnel spécifique au
	tube neural.....
	69
7.2	Caractérisation des voies de signalisation contrôlant l'enhancer
	intronique <i>Cdx2NSE</i>
	72

7.3	Caractérisation moléculaire de la régulation de l'enhancer intronique NCE3 de <i>Pax3</i> par les protéines Cdx.....	74
	RÉFÉRENCES.....	75

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Formation des crêtes neurales et du tube neural.....	4
1.2 Migration des cellules de la crête neurale.....	6
1.3 Colonisation des intestins par les cellules de la crête neurale.....	7
1.4 La voie de l'acide rétinoïque.....	11
1.5 La voie FGF.....	12
1.6 La voie BMP.....	14
1.7 La voie Wnt canonique.....	16
1.8 Schéma simplifié du réseau de gènes définissant les extrémités de la plaque neurale.....	17
1.9 Régions régulatrices.....	19
1.10 Le système de recombinaison Cre-LoxP.....	21
1.11 Génération de souris chimériques par agrégation tétraploïde.....	25
1.12 Enhancer <i>Cdx2</i> NSE et construction du transgène.....	26
1.13 Différents patrons d'expression de <i>Pax3</i>	27
5.2 Effets de la voie FGF sur l'activité de l'enhancer <i>Cdx2</i> NSE.....	56
5.3 Effets de la voie BMP sur l'activité de l'enhancer <i>Cdx2</i> NSE.....	58
5.4 Effets de la voie Wnt canonique sur l'activité de l'enhancer <i>Cdx2</i> NSE.....	60
6.1 Effets des protéines Cdx sur l'activité de l'enhancer intronique NCE3 de <i>Pax3</i>	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
3.1	Composants des tampons utilisés dans le test luciférase.....	32
5.1	Exemple de plaque 24 puits.....	54
7.1	Proportions d'embryons avec une fluorescence non spécifiques suivant le fond génétique.....	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGNES ET ACRONYMES

BMP : "bone morphogenetic protein"

CRABP: "cellular retinoic acid-binding protein"

E.: jour embryonnaire murin

ES: cellule souche embryonnaire

FGF : "fibroblast growth factor"

GFP: "green fluorescent protein"

J: jour embryonnaire humain

MTHFR : 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase

NCE : enhancer spécifique de la crête neurale ("neural crest enhancer")

NSE : enhancer spécifique neural ("neural specific enhancer")

NTD : défauts du tube neural ("neural tube defects")

-pb : paires de bases

RA : acide rétinoïque ("retinoic acid")

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque

RARE : élément de réponse à l'acide rétinoïque ("retinoic acid responsive element")

RXR : "retinoid X receptor"

Shh: Sonic hedgehog

Wnt : contraction de "Wingless" et "int"

YFP : "yellow fluorescent protein"

RÉSUMÉ

Chez les vertébrés, la neurulation représente les premiers stades de développement du système nerveux durant l'embryogenèse. Elle consiste en la formation, à partir du neuroectoderme, des premières ébauches du système nerveux. Ce processus est finement régulé par un réseau complexe de gènes et le dérèglement de l'un d'entre eux peut entraîner le développement d'une maladie congénitale. Le traitement et la prévention de ces maladies passent par le savoir et la compréhension des différents processus impliqués dans le développement du système nerveux. La souris est un bon modèle d'étude *in vivo* de la neurogenèse et la technologie Cre-LoxP permet de contrôler l'activation spatiotemporelle d'un transgène. Cependant, aucun modèle de souris ne cible spécifiquement la plaque postérieure durant la neurulation de l'embryon. L'enhancer intronique *Cdx2*NSE a été caractérisé comme capable de récapituler l'expression du gène *Cdx2* dans la plaque neurale postérieure. Notre nouvelle lignée de souris transgénique *Cdx2*NSE-Cre est capable d'exprimer la recombinase Cre dès le jour embryonnaire 7.5 (E.7.5) dans la plaque neurale postérieure. Elle permet ainsi de cibler le tube neural avec comme limite antérieure la partie caudale du rhombocéphale. Dans ces mêmes limites, toutes les structures dérivées des cellules de la crête neurale vont également être ciblées par notre nouveau modèle murin, ce qui en fait un très bon outil pour l'étude de la neurogenèse. Le mécanisme de régulation des protéines Cdx spécifiquement dans le neuroectoderme est à ce jour toujours méconnu. L'étude *in vitro* de ce même enhancer *Cdx2*NSE nous a permis de montrer que les trois principales voies de signalisation impliquées dans le développement neural et dans l'induction des cellules de la crête neurale, à savoir les voies FGF, BMP et Wnt canonique, sont capables d'en réguler son expression sous le contrôle du gène rapporteur de la luciférase. Enfin, différentes études suggèrent une implication des protéines Cdx dans l'induction des cellules de la crête neurale et dans la fermeture du tube neural, notamment par la régulation de *Pax3*. Les enhancers de la crête neurale de *Pax3* NCE1 et NCE2 sont effectivement régulés par la voie Wnt-Cdx (Sanchez-Ferras et al., 2012) mais un troisième enhancer de la crête neurale (NCE3) a été également caractérisé (Dagenhardt et al., 2010). Nos résultats préliminaires en essai luciférase nous suggèrent une régulation positive de cet enhancer NCE3 par les protéines Cdx1 et Cdx2.

Mots clés : neurogenèse, *Cdx2*NSE, souris, voies de signalisation, Cdx, *Pax3*, NCE3

INTRODUCTION

Chez les vertébrés, le développement du système nerveux passe par un processus appelé neurulation qui se déroule durant les étapes précoces du développement embryonnaire, lors de la mise en place des différents axes de polarité. Le système nerveux est une structure dérivée du neuroectoderme, un tissu embryonnaire présent sous la forme d'une plaque neurale au niveau du pôle dorsal de l'embryon. Lors de l'élongation de l'embryon, les bords de cette plaque neurale vont se replier et fusionner pour former les premières ébauches du système nerveux central et périphérique.

Des défauts de formation peuvent survenir lors de la mise en place du système nerveux, entraînant dans la plupart des cas une létalité embryonnaire. Il est cependant possible que le nouveau-né développe une maladie congénitale due à un défaut de fermeture du tube neural (NTD) dont la plus fréquente est la *spina bifida*. Les conséquences varient suivant la gravité de la malformation. Les nouveau-nés atteints de NTD peuvent généralement développer des troubles sensitifs et moteurs allant jusqu'à la paralysie, des anomalies morphologiques de la moelle, des vertèbres et des côtes mais également des retards mentaux. De très nombreuses autres maladies congénitales liées à des malformations du système nerveux sont regroupées sous le terme de neurocristopathies. Leurs symptômes sont multiples et variées, allant du trouble du transit intestinal jusqu'à différentes sortes de cancer. L'ensemble de ces défauts de développement du système nerveux correspondent chez les nouveaux-nés à une prévalence de 1:500, en faisant un axe de recherche important dans la prévention et le traitement des maladies congénitales.

Le développement du système nerveux est étroitement lié à la mise en place de l'axe antéropostérieur. Par exemple, les signaux de postérisation Wnt, FGF et RA jouent un rôle majeur dans l'induction des cellules de la crête neurale et de la fermeture du tube neural. Les protéines Cdx sont connues pour jouer un rôle de médiateur de ces signaux de postérisation, notamment en régulant directement

l'expression de plusieurs gènes *Hox* qui sont essentiels dans la régionalisation le long de l'axe antéropostérieur. Le rôle des protéines Cdx dans le neuroectoderme n'est cependant que très peu connu, mais leur conservation dans l'évolution et leur localisation spatio-temporelle en font de très bons candidats pour l'induction des cellules de la crête neurale et de la fermeture du tube neural. Une récente publication (Sanchez-Ferras et al. 2012) démontre effectivement que les protéines Cdx sont capables d'intégrer les signaux de postériorisation Wnt pour réguler de manière directe l'expression de *Pax3*, un gène essentiel dans le développement du tube neural et des cellules de la crête neurale.

Il nous semble donc primordial pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du système nerveux d'approfondir les études sur les fonctions neurales des protéines Cdx par la caractérisation de co-facteurs et/ou de cibles neurales. L'étude de l'expression spécifique des protéines Cdx dans le neuroectoderme pourra également nous servir pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement neural chez la souris qui sera notre modèle d'étude *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires murines mais aussi *in vivo* en utilisant des souris transgéniques.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Embryogenèse et développement du neuroectoderme

Durant l'embryogenèse, la formation du système nerveux débute durant les étapes précoces du développement. En effet, la neurulation commence durant la gastrulation et son développement va coïncider avec la mise en place des axes de polarité de l'embryon. Le début de la neurulation correspond à la transformation de l'ectoderme sus-chordal en neuroectoderme au niveau dorsal de l'embryon au 19^e jour chez l'humain ou J19 (jour embryonnaire 7.0 chez la souris ou E.7.0). Ce neuroectoderme forme la plaque neurale au niveau du pôle crânial qui va s'étendre vers le pôle caudal en suivant la ligne primitive (Copp et al., 2003).

Ensuite, les bords de la plaque neurale se soulèvent et commencent à se différencier des cellules du centre de la plaque neurale. C'est la formation des cellules progénitrices de la crête neurale au niveau des extrémités de la plaque neurale qui entourent la gouttière neurale (cellules progénitrices du tube neural) au 23^e jour (ou E.7.5). Ces extrémités continuent à se surélever, vont converger et vont finir par fusionner pour entraîner la fermeture du tube neural au 28^e jour (ou E.8.5). Ce phénomène a lieu tout d'abord au niveau du tronc de l'embryon puis va s'étendre vers les extrémités rostrales et caudales tel une fermeture éclair. Le tube neural rostral va former l'encéphale alors que le tube neural caudal va former la moelle épinière. La fermeture du tube neural au niveau caudal est concomitante avec l'élongation postérieure (Figure 1.1).

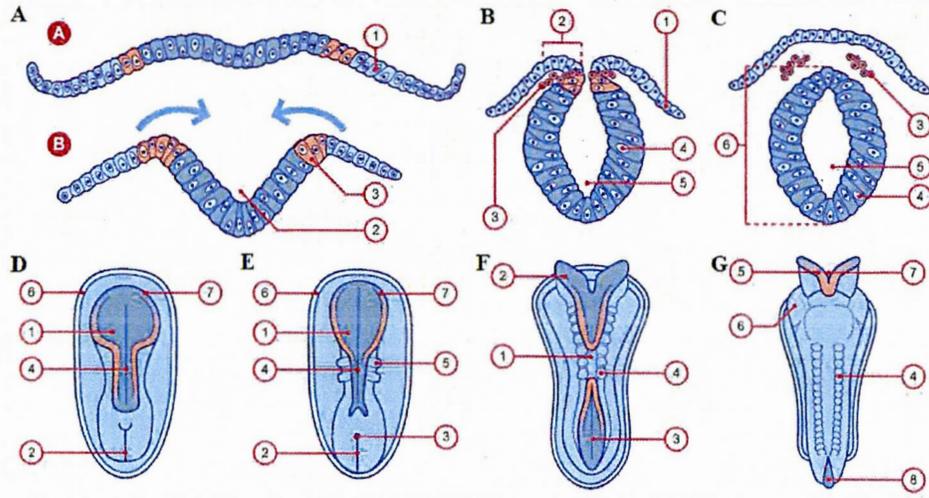


Figure 1.1. Formation des crêtes neurales et du tube neural. Visualisation en coupe transversale de la formation des crêtes neurales (A) A : plaque neurale ; B : gouttière neurale ; 1 : ectoderme ; 2 : gouttière neurale ; 3 : crête neurale. Visualisation en coupe transversale de la fermeture du tube neural (B et C) 1 : ectoderme ; 2 : bourrelets neurales ; 3 : cellules de la crête neurale en migration ; 4 : neuroépithélium ; 5 : canal épendymaire ; 6 : tube neural. Vue dorsale de la plaque neurale et de la gouttière neurale (D et E) 1 : plaque neurale ; 2 : ligne primitive ; 3 : nœud primitif ; 4 : gouttière neurale ; 5 : somites ; 6 : bords de l'amnios ; 7 : bourrelets neurales. Vue dorsale de la fermeture du tube neural (F et G) 1 : bourrelets neurales fusionnés ; 2 : bourrelet neural ; 3 : gouttière neurale ; 4 : somites ; 5 : crête neurale (orange) ; 6 : renflement péricardique ; 7 : neuropore rostral ; 8 : neuropore caudal. Figures récupérées depuis le site www.embryology.ch.

Lors de la fermeture du tube neural, la population cellulaire présente au niveau des extrémités de la plaque neurale se détache pour former les crêtes neurales. Ces cellules de la crête neurale sont des cellules souches multipotentes qui possèdent une forte capacité de prolifération, de migration et de différenciation. Une fois les crêtes neurales formées, ces cellules vont ensuite subir un phénomène de transformation épithéliale-mésenchymale. Ce processus se caractérise par la perte de l'adhésion cellulaire et de la polarité membranaire et par l'acquisition d'un fort pouvoir migratoire (Savagner, 2010 ; Sylvie et al., 2011). Cette transformation cellulaire va permettre, sous l'influence d'une association de voies de

signalisation, d'induire la délamination des crêtes neurales (Burstyn-Cohen et al., 2004).

Les cellules de la crête neurale vont donc migrer dans la quasi-totalité de l'organisme pour former de nombreux types cellulaires (Figure 1.2). Elles vont suivre trois voies de migration différentes dépendamment du temps dans le développement (Erickson et Weston, 1983 ; Serbedzija et al., 1990). La "vague précoce" correspond aux premières cellules de la crête neurale qui vont migrer de manière ventrolatérale en passant dans l'espace intersomitique (Loring et Erickson, 1987). La "vague tardive" se caractérise par une migration dorsolatérale entre l'épiderme et la partie postérieure du somite différencié, le dermomyotome (Rickman et al., 1985). La "vague intermédiaire" migre quant-à elle de manière ventromédiale en passant à travers la partie inférieure du somite différencié, le sclérotome (Bronner-Fraser, 1986). Cette migration est restreinte à la partie antérieure de chaque sclérotome et ne migre pas caudalement dans un autre somite. Cette segmentation dans la migration va permettre une organisation métamérique des structures dérivées des cellules de la crête neurale (Teillet et al., 1987).

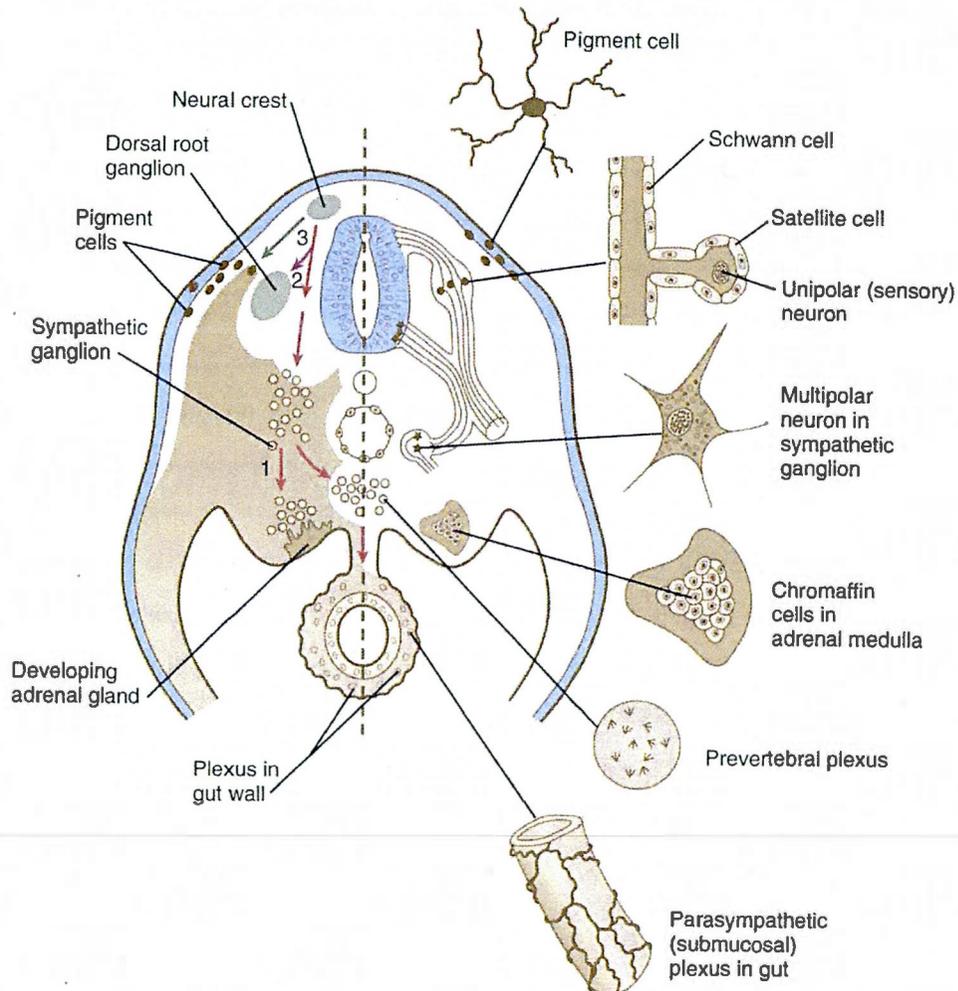


Figure 1.2. Migration des cellules de la crête neurale. Visualisation en coupe transversale des vagues de migration précoce (1), intermédiaire (2) et tardive (3) des cellules de la crête neurale ainsi que la position de certains de leurs dérivés au niveau du tronc. Figure récupérée depuis *Human Embryology and Developmental Biology*, 5^e édition.

Les cellules de la crête neurale crâniale vont ainsi contribuer à la formation des cartilages fronto-nasaux, hyoïdien et thyroïdien, des os de la face, des mélanocytes et de l'oreille interne. Les cellules de la crête neurale colonisant la région cardiaque de l'embryon proviennent de la partie antérieure de la crête

neurale vagale. Ces cellules vont se différencier en neurones, mélanocytes, cartilage et tissu conjonctif de certains arcs branchiaux et des artères. Les cellules de la crête neurale du tronc vont coloniser la majeure partie de l'embryon et vont être à l'origine de mélanocytes et des différents types de cellules neurales formant le système nerveux périphérique. Enfin, les cellules de la crête neurale au niveau vagal et sacral permettent la mise en place du système nerveux entérique avec une contribution mineure de celles de la partie antérieure du tronc (Figure 1.3).

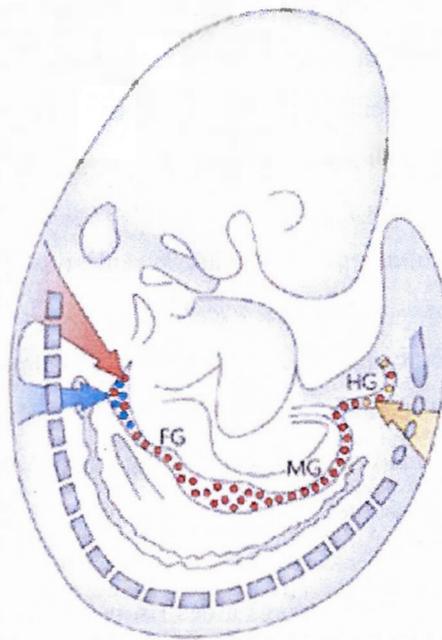


Figure 1.3. Colonisation des intestins par les cellules de la crête neurale. Schéma représentant la migration des cellules de la crête neurale vagues (rouge) et de la partie antérieure du tronc (bleu) dans la partie antérieure de l'intestin. Les cellules de la crête neurale sacrales (jaune) migrent directement dans la partie postérieure de l'intestin. Figure récupérée depuis Heanue et Pachnis, 2007.

1.2 Défauts de développement et maladies associées

La dérégulation de l'un des acteurs de ce vaste réseau peut donc déséquilibrer l'organisation de ces structures et entraîner une malformation congénitale, une maladie génétique ou encore une transformation tumorale. Les défauts de développement du tube neural entraînent deux types de maladies associées suivant la localisation de ces défauts.

Le *spina bifida* se caractérise par un défaut de fermeture du tube neural dans la partie caudale de l'embryon. Pour la forme la plus légère, le tube neural ne reste ouvert que dans la partie lombo-sacrée (*spina bifida occulta*) entraînant un défaut de fermeture des vertèbres. Lorsque ces défauts de fermeture sont plus importants, les malformations vertébrales permettent aux méninges recouvrant la moelle épinière de sortir par une fente de la colonne vertébrale et de se développer dans un sac largement visible dans le dos. Dans la forme la plus rare (*spina bifida méningocèle*), les méninges ne baignent que dans du liquide céphalorachidien entraînant des troubles mineurs de motricité, de sensibilité et d'incontinence. Dans la forme la plus grave (*spina bifida myéломéningocèle*), ce sac dorsal contient également une partie du canal de la moelle épinière et des racines nerveuses. La sévérité des symptômes dépend de la gravité des défauts et de la remontée vers les vertèbres thoraciques, mais son diagnostic est généralement associé avec des paralysies motrices, des troubles intestinaux et urinaires. Ces personnes sont, pour des raisons inconnues, plus susceptibles à des troubles de l'apprentissage (dyslexie, concentration) et sont sujets à des risques d'infection, notamment aux méningites (Gressens et al., 1998).

Le principal traitement de cette maladie est l'opération chirurgicale chez le fœtus ou le nouveau-né pour refermer la fente de la colonne vertébrale et empêcher la formation du sac externe, l'aggravation des lésions neurales et les risques d'infections. Il n'existe cependant aucun traitement pour réparer les nerfs endommagés et les autres traitements sont symptomatiques. Il a été cependant

démontré que le *spina bifida* est partiellement dû à des facteurs génétiques. Il existe plus de 200 gènes impliqués dont le principal est un allèle mutant du gène codant pour la MTHFR, une enzyme clef dans le métabolisme de l'acide folique et de l'homocystéine. Le traitement préventif des femmes enceintes à l'acide folique permet une diminution de 50 à 85% des risques de *spina bifida* chez le fœtus (Copp et al., 2013).

Une malformation du tube neural antérieur entraîne une sévère malformation du cerveau appelée anencéphalie. Cette maladie entraîne une absence partielle ou totale du cerveau. Si le fœtus survit et que le nouveau-né ne meurt pas à la naissance, l'enfant n'a une espérance de vie que de quelques jours maximum. Ces nouveau-nés sont habituellement sourds et aveugles, ils sont inconscients et ne ressentent aucune douleur. Il n'existe aucun traitement à cette maladie (Copp et al., 2013).

Enfin, une malformation du tube neural aux extrémités antérieures et postérieures entraîne la maladie la plus sévère des défauts de développement neuraux, la craniorachischisis. Elle combine à la fois une anencéphalie et un *spina bifida* ce qui entraîne une létalité embryonnaire ou des enfants mort-nés (Copp et al., 2013).

Les maladies liées aux défauts de développement des cellules de la crête neurale sont regroupées sous le terme de neurocristopathies. Elles peuvent être liées à une prolifération tumorale telle que les neuroblastomes qui dérivent des cellules de la crête neurales qui restent dans un état indifférencié et gardent donc leur fort pouvoir de prolifération et de migration. Les neurocristopathies peuvent également être dues à un défaut de développement ou de migration des cellules de la crête neurale (Stovroff et al., 1995). Dans la maladie de Hirschsprung, un retard de colonisation des précurseurs du système nerveux entérique dans les intestins entraîne une aganglionose d'une partie ou de la totalité du côlon. Ce défaut de migration va entraîner une absence de mouvements péristaltiques, une occlusion de la matière fécale et un gonflement des intestins. La sévérité de la maladie peut aller d'une légère diminution de l'efficacité du transit intestinal qui passe

généralement inaperçue à une occlusion totale qui bloque tout écoulement de matière fécale. Pour les cas les plus sévères, une ablation de la partie aganglionnaire est nécessaire pour reconstituer un système digestif fonctionnel. De nombreux gènes et associations de gènes peuvent être impliqués dans le développement de cette maladie (Heanue et Pachnis, 2007 ; Bergeron et al., 2013). Une autre neurocristopathie est le syndrome de Waardenburg qui peut être associé à la surdité et à des défauts de pigmentation de la peau, des cheveux et de l'iris. Ce syndrome est classé en quatre types, possède une association génétique complexe et peut être associé à d'autres maladies telles que la maladie de Hirschsprung (Mahmoudi et al., 2013).

1.3 Voies de signalisation

La formation du système nerveux est étroitement liée à la mise en place des axes de polarité de l'embryon. En effet, les voies de signalisation impliquées dans la mise en place des axes de polarité sont également essentielles à la fermeture du tube neural et la formation des crêtes neurales (Villanueva et al., 2002).

L'acide rétinoïque correspond à l'une des formes de la vitamine A dans l'organisme. Le rétinol correspond à la forme native de la vitamine A qui une fois intégré dans la cellule va être oxydé en rétinol puis en acide rétinoïque (Yang et al., 1994). Des protéines cellulaires de fixation de l'acide rétinoïque, les CRAPBs, permettent son entrée dans le noyau où il interagit avec des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR et RXR) et reconnaît ses sites potentiels de fixation RARE (retinoic acid responsive element) pour moduler l'expression de ces gènes cibles (Figure 1.4).

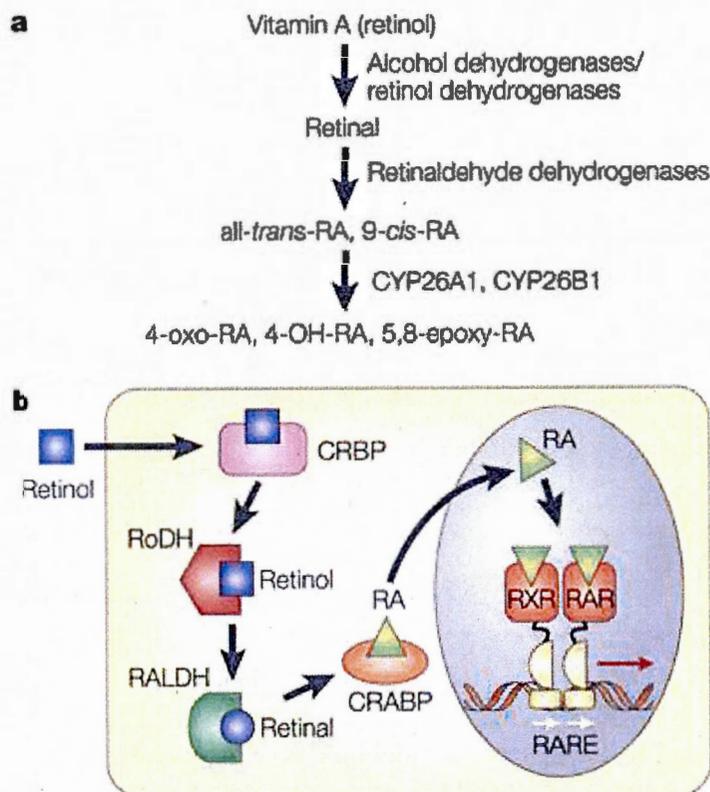


Figure 1.4. La voie de l'acide rétinoïque. Schéma représentant la conversion métabolique des différentes formes de l'acide rétinoïque (A). Mécanisme cellulaire d'action de l'acide rétinoïque (B). CRBP : cellular retinol binding protein ; RoDH : retinol dehydrogenase ; RALDH : retinaldehyde dehydrogenase ; CRABP : cellular retinoic acid binding protein ; RA : retinoic acid ; RAR : retinoic acid receptor ; RXR : retinoid X receptor ; RARE : retinoic acid responsive element. Figure récupérée de Maden, 2002.

La voie de l'acide rétinoïque contribue à la mise en place de l'axe antéro-postérieur en stimulant la différenciation et la régionalisation, notamment par l'intermédiaire des gènes *Hox* (Serpente et al., 2005). Elle permet entre autres le développement du rhombocéphale et du système digestif. Les signaux de l'acide rétinoïque provenant du mésoderme paraxial sont également requis pour la régulation de l'induction des crêtes neurales avec les signaux FGF (Martínez-Morales et al., 2011). Une étude récente sur des embryons de poulet met en avant

la possible contribution de l'acide rétinoïque dans le tube neural pour le maintien des voies de signalisation FGF et Notch (Paschaki et al., 2012). Enfin, cette voie contribuerait également à la mise en place de l'axe proximo-distal, possiblement par son rôle d'antagoniste des signaux FGF (Sirbu et Duester, 2006).

La voie FGF correspond à une superfamille de 25 ligands qui reconnaissent 4 récepteurs subissant des épissages alternatifs et peut utiliser différentes cascades de signalisations (PI3K, MADPK, ERK1/2...) pour la régulation de ces gènes cibles (Figure 1.5).

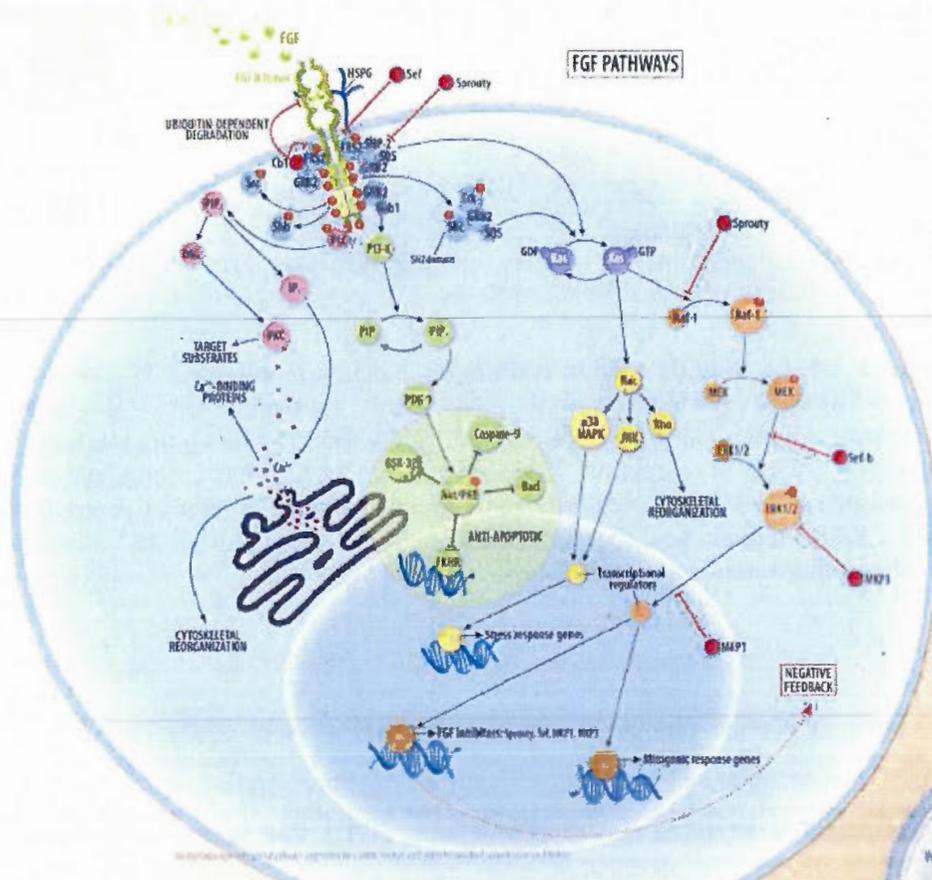


Figure 1.5. La voie FGF. Schéma récapitulatif des différentes voies utilisées par la superfamille des ligands FGF. Figure récupérée depuis le site www.RnDSystems.com/go/FGFfamily

La voie FGF est essentielle à la mise en place de l'axe antéro-postérieur en contribuant au développement du mésoderme et du neuroectoderme postérieur en combinaison avec les signaux Wnt (Doniach, 1995 ; Lamb et Harland, 1995 ; Kudoh et al., 2002). Les signaux de la voie FGF forment également un gradient du centre de la plaque neural vers l'ectoderme non neural qui est nécessaire et à l'induction et à la maintenance des cellules de la crête neurale (Stuhlmiller et García-Castro, 2012). Ce gradient contribuerait également à la mise en place de l'axe proximo-distal (Sirbu et Duester, 2006).

La voie BMP est étroitement liée à la voie TGF β puisque elles vont toutes les deux utiliser les protéines Smad comme effecteurs (Figure 1.6). La protéine Smad4 est même le co-facteur essentiel pour ces deux voies puisqu'il va se complexer avec Smad 1/5/8 dans la voie BMP et Smad 2/3 dans la voie TGF β (Miyazono, 1999).

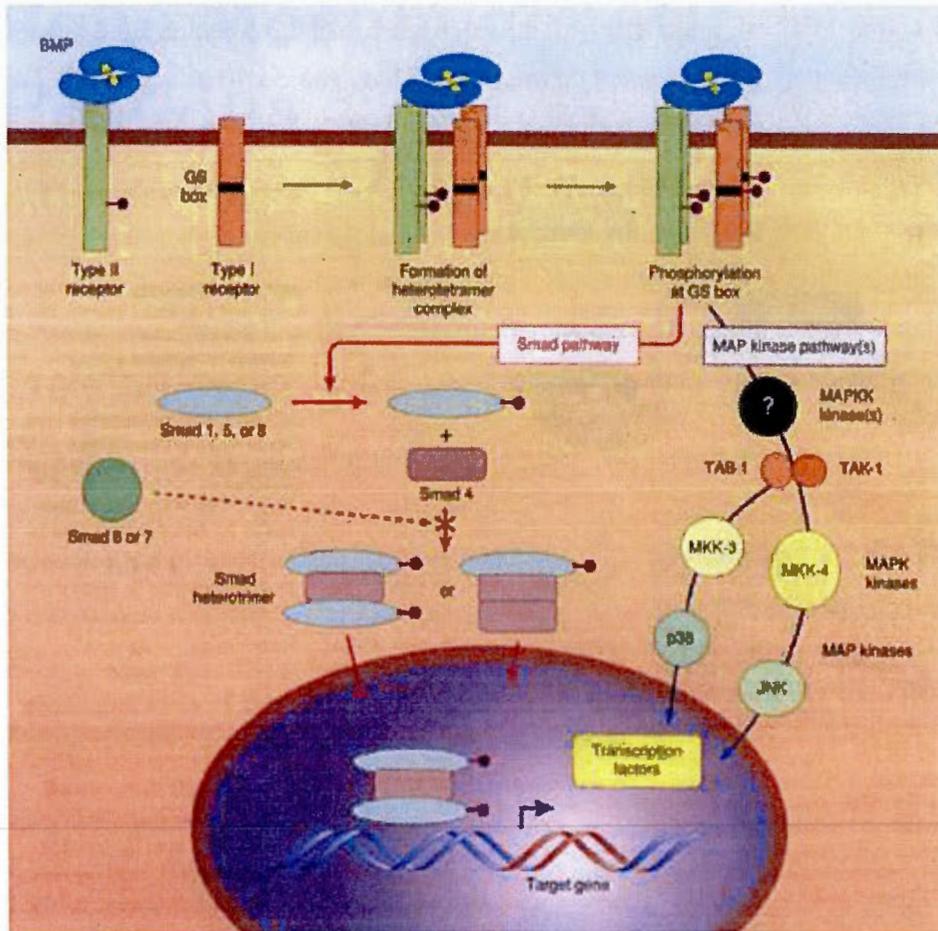


Figure 1.6. La voie BMP. Schéma récapitulatif de la voie de signalisation BMP. Le ligand BMP entraîne l'hétérodimérisation du récepteur qui va phosphoryler les effecteurs Smad 1, 5 ou 8 qui se lie ensuite avec Smad4 pour leur translocation dans le noyau et ainsi moduler l'expression de leurs gènes cibles. Figure récupérée depuis Demers et Hamdy, 1999.

La voie BMP contribue à la fois à la mise en place des axes antéro-postérieur, proximo-distal et dorso-ventral (Constance Lane et al., 2004 ; Tonegawa et al., 1997 ; Bier, 2011). Les signaux BMP forment un gradient allant de la région dorsale à la région ventrale en tant qu'antagonistes des signaux Sonic hedgehog (Shh), ainsi qu'un gradient allant de l'ectoderme non-neural à la plaque neurale. C'est ce gradient dans l'ectoderme qui va permettre l'induction des crêtes neurales

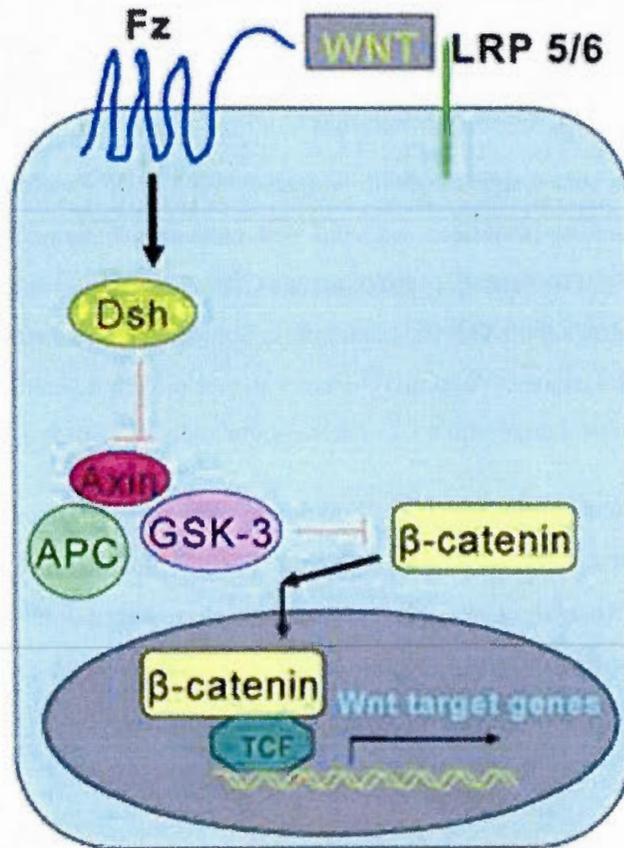
par la présence dans les extrémités de la plaque neurale de niveaux intermédiaires de signaux BMP (Steventon et al., 2009).

La voie Wnt contribue à la mise en place de l'axe antéro-postérieur en stimulant la régionalisation (Iimura et al., 2009), l'élongation (Gong et al., 2004) et la postériorisation (Hoppler et al., 1996) de l'embryon. Le contrôle de la régionalisation par la voie Wnt passe par la régulation de l'expression des gènes *Hox*. Ces gènes sont responsables de la segmentation et de l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur. La voie Wnt contribue également à la mise en place de l'axe dorso-ventral par des signaux de dorsalisation antagonistes aux signaux de ventralisation Shh provenant de la notochorde (Alvarez-Medina et al., 2008). Enfin, les signaux Wnt sembleraient essentiels dans la mise en place de l'axe proximo-distal en régulant l'asymétrie gauche-droite (Nakaya et al., 2005).

Les signaux Wnt proviennent de l'ectoderme non neural et du mésoderme paraxial et sont essentiels pour la fermeture du tube neural et la formation des crêtes neurales (Kudoh et al., 2002) en régulant, de manière directe ou indirecte, l'expression de différents marqueurs spécifiques à ces structures embryonnaires (Monroso-Burq et al., 2005 ; Taneyhill et Bronner-Fraser, 2005 ; Takemoto et al., 2006).

Dans la voie de signalisation Wnt canonique, la β -caténine est la protéine clef qui va permettre la régulation des gènes cibles (Figure 1.7). Située dans le cytoplasme, elle est constitutivement phosphorylée par le complexe GSK3/APC/Axine ce qui entraîne sa dégradation. Lorsque les protéines Wnt sont présentes dans le milieu extracellulaire, elles se fixent sur leur récepteur constitué des protéines transmembranaires Frizzled et LRP. Ce récepteur activé va phosphoryler Dishevelled qui elle-même va empêcher la formation du complexe GSK3/APC/Axine. La β -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et entre dans le noyau pour s'associer avec les membres de la famille des facteurs de transcription Lef/Tcf (Lef1, Tcf1, Tcf3 et Tcf4). Les différents hétérodimères

peuvent ainsi aller réguler l'expression de leurs gènes cibles (Moon et al., 2002; Logan and Nusse, 2004).



Breast Cancer Research

Figure 1.7. La voie Wnt canonique. La β -caténine est constitutivement phosphorylée par le complexe GSK3/APC/Axine ce qui entraîne sa dégradation. Lorsque les protéines Wnt sont présentes dans le milieu extracellulaire, elles se fixent sur leur récepteur constitué des protéines transmembranaires Frizzled et LRP. Ce récepteur activé va phosphoryler Dishevelled qui elle-même va empêcher la formation du complexe GSK3/APC/Axine. La β -caténine s'accumule alors dans le cytoplasme et entre dans le noyau pour s'associer avec les membres de la famille de facteurs de transcription Lef/Tcf (Lef1, Tcf1, Tcf3 and Tcf4). Les différents hétérodimères peuvent ainsi aller réguler l'expression de leurs gènes cibles. Schéma récupéré depuis Liu et al., 2005.

L'ensemble de ces voies de signalisation va donc interagir pour permettre la formation du tube neural et des cellules de la crête neurale (Villanueva et al., 2002). L'intégration de ces différents signaux va induire l'expression de plusieurs facteurs de transcription spécifiques de ces structures neurales et la mise en place d'un réseau complexe de gènes de régulation (Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008 ; Betancur et al., 2010) (Figure 1.8).

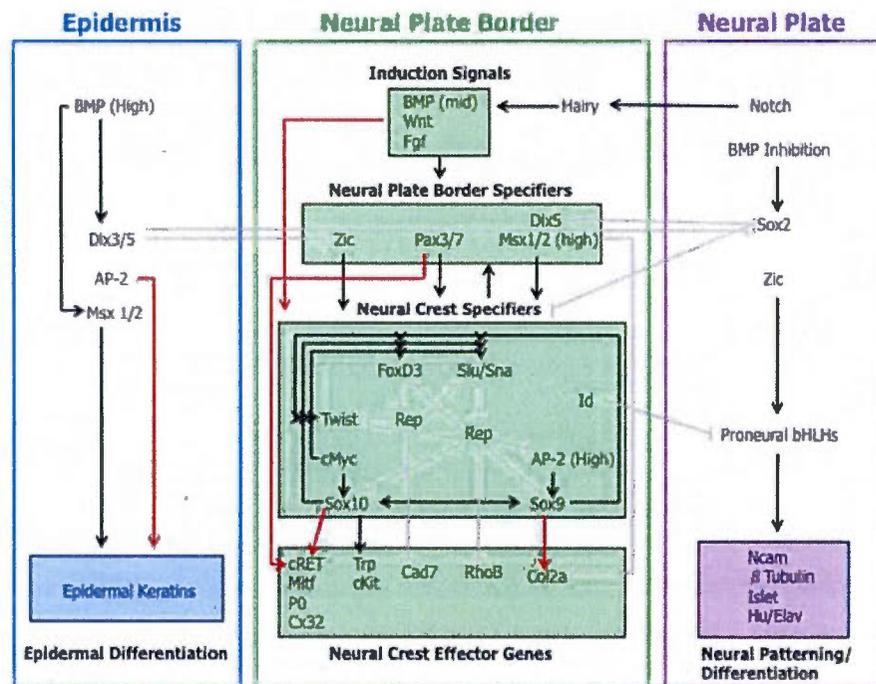


Figure 1.8. Schéma simplifié du réseau de gènes définissant les extrémités de la plaque neurale. La combinaison des différentes voies de signalisation vont permettre l'induction des extrémités de la plaque neurale puis la formation des crêtes neurales. Les voies de signalisations Wnt, BMP et FGF vont induire la spécification en cellules de la crête neurale en régulant les « neural plate border specifiers » tels que *Pax3*, *Zic1*, *Zic2*, *Zic3*, *Msx1* et *Msx2*. Ces derniers vont permettre la différenciation finale en cellules de la crête neurale en régulant l'expression des « neural crest specifiers » tels que *FoxD3*, *Sox9*, *Sox10* et *Snail2*. Schéma récupéré depuis [Meulemans D](#) et [Bronner-Fraser M.](#) 2004.

Ainsi, les signaux Wnt et FGF vont permettre la première phase de l'induction des crêtes neurales. Cela va entraîner la spécification des extrémités de la plaque neurale grâce à l'expression essentielle du facteur de transcription Pax3 mais également celles de Zic1, Zic2, Zic3, Msx1 et Msx2. Ils sont regroupés sous le terme anglais de "neural plate border specifiers" et sont des marqueurs précoces des futures crêtes neurales. Les facteurs de transcription Sox2 et Sox3 sont les deux principaux marqueurs de la plaque neurale, Sox2 étant considéré comme marqueur neural le plus précoce et le régulateur clé du développement neural. Lors de la deuxième phase d'induction des crêtes neurales, les signaux BMP et Wnt vont permettre l'expression des facteurs de transcriptions FoxD3, Sox9, Sox10 et Snail2 (neural crest specifiers) et ainsi entraîner la différenciation en cellules de la crête neurale.

1.4 Régulation génétique et technologie Cre-LoxP

L'expression d'un gène se fait par le recrutement des différentes protéines constituant le complexe de transcription au niveau de son site d'initiation de la transcription. Cette expression est régulée par des facteurs de transcription qui vont reconnaître leur site de fixation sur l'ADN et ainsi moduler l'efficacité de fonctionnement du complexe de transcription. Ces séquences d'ADN comprenant un ou plusieurs sites de fixation capables de réguler l'expression d'un gène sont appelées séquences régulatrices. Elles peuvent être activatrices, en ne recrutant que des facteurs de transcription augmentant l'efficacité de la transcription, elles peuvent être inhibitrices, en ne recrutant que des facteurs de transcription diminuant l'efficacité de la transcription, ou bien elles peuvent être les deux à la fois. Il se peut qu'une région régulatrice possède à la fois des sites de fixation pour des facteurs de transcription activateurs et inhibiteurs ou qu'un même site de

fixation soit capable de recruter à la fois des activateurs et des inhibiteurs. Il se peut également qu'un ou des cofacteurs soient nécessaires, ou bien que les séquences d'ADN ne soient pas forcément accessibles. C'est donc l'ensemble de ces conditions qui va permettre de créer l'environnement spécifique nécessaire à l'expression d'un gène et par extension de créer le patron d'expression spatio-temporel propre à chaque gène (Figure 1.9).

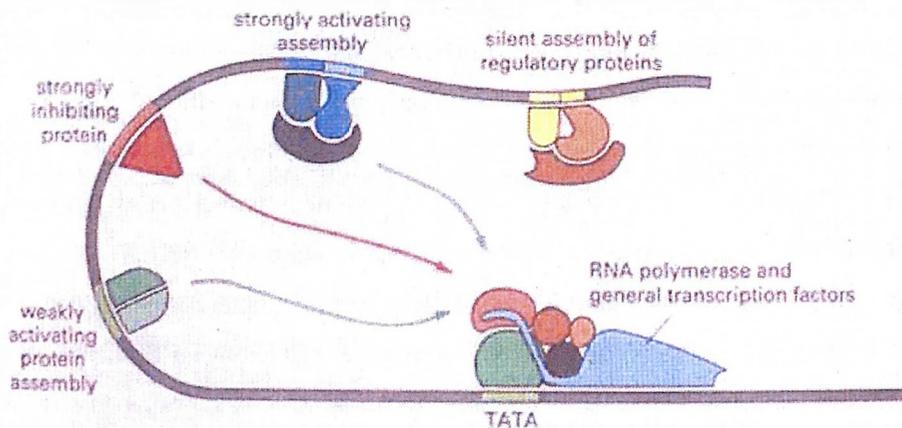


Figure 1.9. Régions régulatrices. Schéma représentatif de la diversité de régulation d'un gène par différentes régions régulatrices. Figure récupérée depuis www.ucl.ac.uk/~ucbzwdr/teaching/b250-99/enhancers.htm

Par exemple, le gène *Pax3* est exprimé à la fois dans le neuroectoderme et le mésoderme. Dans le neuroectoderme, il est nécessaire pour la fermeture du tube neural et l'induction et la maintenance des cellules de la crête neurale. Dans le mésoderme paraxial, il va contribuer à la formation du dermamyotome et à la myogenèse (Mansouri, 1998). Des études ont montrées que deux séquences régulatrices présentes dans son promoteur proximal étaient fortement conservées dans l'évolution et capables de récapituler seulement son expression neurale (Milewski et al., 2004 ; Pruitt et al., 2004). Ces séquences, appelées NCE ("neural crest enhancer"), sont un bon exemple pour expliquer qu'un même gène peut

utiliser des facteurs de transcription différents et des séquences régulatrices différentes pour réguler son expression dans différents types cellulaires.

L'étude *in vivo* d'une fonction spécifique d'un gène peut donc être étudiée en modulant son expression dans une population cellulaire ciblée en utilisant ces séquences régulatrices spécifiques. La modulation de l'expression d'un gène va se faire soit par son inhibition, soit par sa surexpression.

Une méthode classique utilisée avec les modèles murins est la technologie Cre-LoxP. Elle se sert de la recombinaise bactérienne Cre qui reconnaît spécifiquement ses sites de recombinaison LoxP, eux aussi seulement présents chez les procaryotes. Ces composants procaryotes n'ont en soit aucun effet sur les cellules eucaryotes et vont nous permettre d'induire des modifications génétiques par simple reproduction entre souris. Ce système indirect utilise deux lignées de souris transgéniques chacune contenant un des composants procaryote. Dans l'une, les sites LoxP encadrent une cassette interférente (contenant un codon stop) ce qui bloque l'expression constitutive d'un ARN interférant ou d'une protéine permettant la modulation de l'expression du gène cible. Dans l'autre, la recombinaise Cre est exprimée sous le contrôle d'une région promotrice spécifique de la population cellulaire ciblée. L'accouplement entre ces deux lignées de souris va permettre de moduler l'expression spatio-temporelle du gène cible dans les embryons contenant les deux transgènes. La recombinaise Cre est exprimée seulement dans la population cellulaire ciblée et va couper l'ADN spécifiquement au niveau des sites LoxP. La cassette interférente s'excise (Figure 1.10) ce qui permet l'expression constitutive de l'ARN interférant ou de la protéine qui va moduler l'expression du gène cible seulement dans notre population cellulaire cible (Orban et al., 1992).

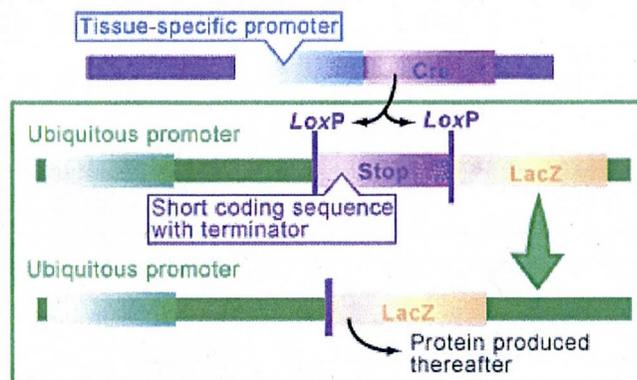


Figure 1.10. Le système de recombinaison Cre-LoxP. Schéma représentatif de l'excision d'une cassette interférence (Stop) lors du croisement entre deux lignées de souris transgéniques, l'une exprimant la recombinase Cre dans la population cellulaire ciblée et l'autre la séquence codante à faire exprimer dans ces cellules (LacZ). Figure récupérée depuis le site www.scq.ubc.ca/targeting-tour-dna-with-the-crelox-system/.

L'un des avantages (ou inconvénient suivant l'étude) de cette technique est que la recombinaison entraînée après excision est irréversible. Une fois faite, elle se transmet à toutes les cellules filles, la présence de la recombinase Cre n'est donc pas nécessaire dans la durée et toute la descendance est affectée. Ce système permet également de maintenir des lignées de souris transgéniques sans anomalies phénotypiques et d'utiliser de nombreuses combinaisons de croisement. La recombinaison est efficace dans la grande majorité des types cellulaires et peut aussi être induit par utilisation de la drogue tétracycline lorsque la Cre est exprimée sous forme de protéine de fusion Cre-ERT, contenant le domaine de liaison au ligand du récepteur aux estrogènes (Utomo et al., 1999). L'un des désavantages est que la spécificité est directement liée à celle de la région promotrice qui ne sera pas forcément tout le temps tissu-spécifique et peut donc provoquer une expression indésirable dans d'autres cellules. Un autre inconvénient est que la génération d'une lignée de souris transgénique se révèle souvent longue et coûteuse.

1.5 Protéines Cdx

Les protéines Cdx représentent une famille de facteurs de transcription dérivant de la protéine caudale de drosophile (*Drosophila Caudal*) (Brooke et al., 1998). Ces protéines sont conservées dans l'évolution et fonctionnellement redondantes (van den Akker et al., 2002 ; Savory et al., 2009). Il en existe trois membres chez la souris, Cdx1, Cdx2 et Cdx4. Ces trois protéines contiennent un domaine de fixation à l'ADN (homéodomaine) hautement conservé au sein de cette famille.

Ces protéines sont donc des facteurs de transcription qui sont connus pour jouer un rôle majeur dans l'élongation embryonnaire (Chawengsaksophak et al., 2004). Elles sont également essentielles dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur en régulant l'expression de gènes cibles (Savory et al., 2009-b ; Grainger et al., 2012 ; Sanchez-Ferras et al., 2012) dont certains font partie de la famille des gènes *Hox* (Bel-Vialar et al., 2002 ; Isaacs et al., 1998 ; Charité et al., 1998 ; Shimizu et al., 2006 ; Wang et al., 2008). Pour induire cette régulation, les protéines Cdx sont capables d'intégrer les signaux des voies Wnt, FGF et de l'acide rétinoïque (Prinos et al., 2001 ; Houle et al., 2000, 2003 ; Lickert et al., 2000 ; Keenan et al., 2006 ; Lengerke et al., 2008 ; Sanchez-Ferras et al., 2012). Elles sont d'ailleurs principalement considérées comme des médiateurs de la voie Wnt puisque cette dernière régule directement l'expression de *Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4* (Pilon et al., 2006, 2007 ; Sanchez-Ferras et al., 2012). Ces protéines sont également capables de se réguler entre elles puisqu'il a été démontré que Cdx1 s'autorégule en s'associant avec les effecteurs de la voie Wnt pour former un complexe la β -caténine/Lef1/Cdx1 (Béland et al., 2004), alors que Cdx2 régule l'expression de Cdx4 (Savory et al., 2011).

Les protéines Cdx sont exprimées dans les trois feuilletts embryonnaires de la partie caudale de l'embryon, incluant donc le tube neural et la plaque neurale postérieure. Leur expression dans le neuroectoderme commence au jour

embryonnaire E.7.25 par Cdx1, puis Cdx2 et Cdx4 à E.7.5 (Meyer et Gruss, 1993 ; Beck et al., 1995 ; Gamer et Wright, 1993). Cdx1 a une limite plus antérieure que Cdx2 qui est elle-même plus antérieure que Cdx4.

Les différentes fonctions des protéines Cdx dans l'endoderme et le mésoderme sont principalement connues et grandement étudiées. Dans l'endoderme, les protéines Cdx jouent un rôle majeur comme médiateur des signaux de postériorisation Wnt (Lickert et al., 2000 ; Sherwood et al., 2011) pour la mise en place et la différenciation du système digestif avec notamment Cdx2 comme régulateur central (Kinkel et al., 2008 ; Stringer et al., 2012). Dans le mésoderme, elles relaient les signaux de postériorisation Wnt pour induire l'élongation embryonnaire, la somitogenèse, l'hématopoïèse ainsi que la régionalisation de l'embryon le long de l'axe antéro-postérieur (Chawengsaksophak et al., 2004 ; Wang et al., 2008). Ces fonctions mésodermiques passent notamment par la régulation de l'expression des gènes *Hox* (Pilon et al., 2006, 2007 ; Wang et al., 2008 ; Young et al., 2009).

Les fonctions neurales des protéines Cdx sont quant-à elles moins claires. Des études chez les ascidies ont montré que les protéines Cdx pourraient contribuer à la formation du tube neural et des crêtes neurales de manière tissu-autonome (Jeffery et al., 2004 ; Mita et Fujiwara, 2007). Ces animaux marins sont toutefois assez éloignés des vertébrés au niveau de l'évolution et leur développement est relativement distinct. L'expression des protéines Cdx dans le neuroectoderme est cependant fortement conservée chez les chordés, insinuant donc une fonction primordiale. En effet, tout comme dans l'endoderme et le mésoderme, elles permettent dans le neuroectoderme la régionalisation de l'axe antéro-postérieur en contrôlant la régulation de gènes cibles dont les gènes *Hox* (Bel-Vialar et al., 2002 ; Isaacs et al., 1998 ; Charité et al., 1998 ; Shimizu et al., 2006 ; Skromme et al., 2007 ; Sturgeon et al., 2011). Des études précédentes de perte et gain de fonction dans des modèles *in vivo* murins laisseraient croire à un rôle des protéines Cdx dans la fermeture du tube neural (Charité et al., 1998 ; Van den Akker et al., 2002 ; Gaunt et al., 2008 ; Savory et al., 2011-b ; Van de Ven et al.,

2011). Cependant, elles ne permettent pas d'affirmer de telles fonctions puisque les modulations occasionnées ont eu lieu dans les trois feuillets embryonnaires. Les résultats observés ne peuvent donc pas être attribués à un effet spécifique d'un seul tissu embryonnaire.

L'étude *in vivo* des protéines Cdx chez la souris est donc difficile par le fait qu'elles soient fonctionnellement redondantes, qu'elles soient exprimées et essentielles dans les trois feuillets embryonnaires mais également dans le tissu extra-embryonnaire (Strumpf et al., 2005 ; Savory et al., 2009). En effet, l'expression de *Cdx2* à E.3.5 dans le trophoctoderme est vitale pour l'implantation de l'embryon. Ce dernier point a réussi à être contourné en générant des souris chimériques par agrégation tétraploïde. Un transgène est transfecté de manière stable dans des cellules souches embryonnaires (ES) qui sont ensuite fusionnées avec un embryon tétraploïde au stade blastocyste puis réinjecté dans une mère porteuse. Les cellules tétraploïdes ne vont contribuer qu'à la formation du tissu extra-embryonnaire, soit le sac vitellin et le placenta. Les cellules ES vont quant-à elles former l'intégralité de l'embryon (Figure 1.11). Par cette méthode, il est possible d'inhiber l'expression de *Cdx2* dans l'embryon mais pas dans le trophoctoderme, permettant ainsi l'implantation de l'embryon (Chawengsaksophak et al., 2004 ; Savory et al., 2009-b). Comme dans les autres espèces, le défaut de cette méthode est que le phénotype observé ne peut pas être limité à un seul tissu embryonnaire.

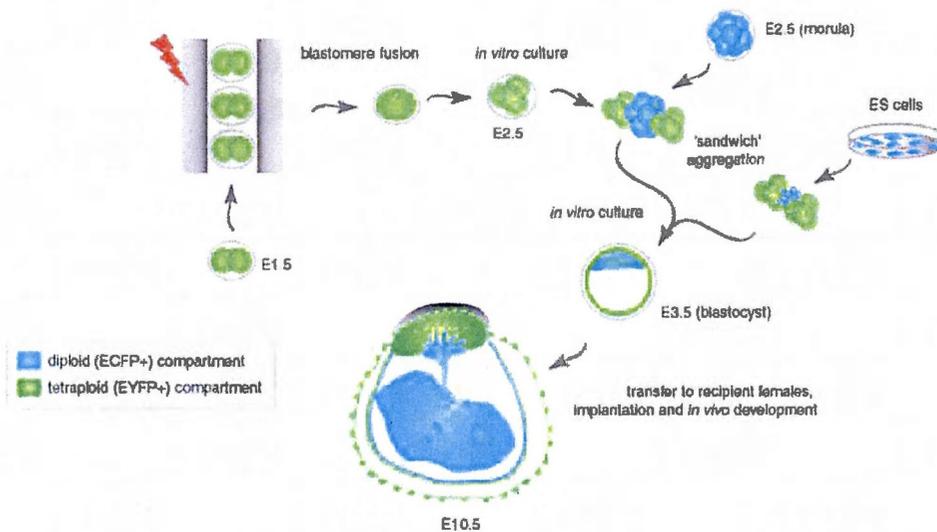


Figure 1.11. Génération de souris chimériques par agrégation tétraploïde. Schéma représentatif de la méthode de fusion entre des cellules ES et un embryon tétraploïde. Figure récupérée depuis Chawengsaksophak et al., 2004.

Une alternative va être l'utilisation de la technologie Cre-LoxP (Orban et al., 1992). Plusieurs lignées murines sont connues pour permettre l'expression de la recombinase Cre de manière tissu spécifique. Par exemple, la lignée murine *T-Cre* présente un profil d'expression spécifique au mésoderme. Si les lignées *Sox1-Cre* et *Nestine-Cre* présentent un profil d'expression dans le neuroectoderme antérieur, la lignée *Pax3-Cre* offre un profil d'expression dans sa partie postérieure mais restreinte à la partie dorsale. Pour ce qui est de l'expression spécifique au tube neural postérieur, l'utilisation de l'enhancer caractérisé de *Cdx2* appelé NSE pour neural specific enhancer (Wang et Shashikant, 2007) pourrait se révéler être un bon outil (Figure 1.12). L'étude *in vitro* de cet enhancer nous permettrait également de déterminer les voies de signalisation responsables de l'expression neurale de *Cdx2*.

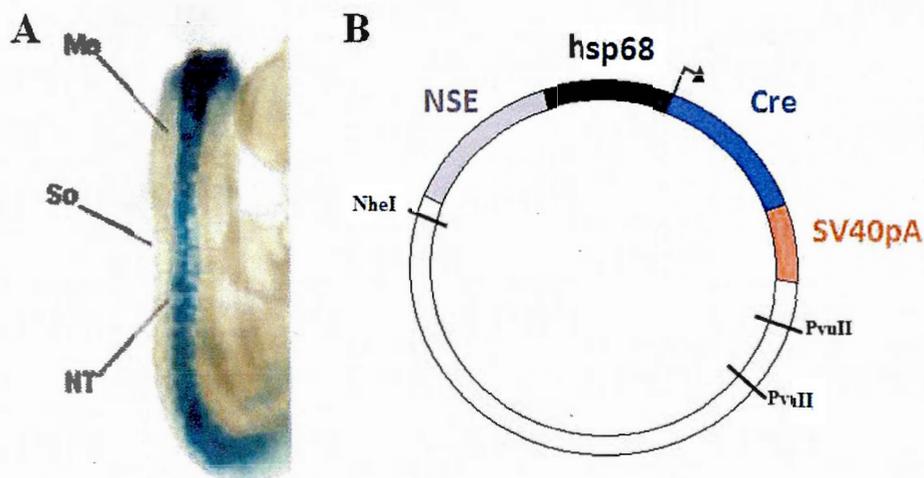


Figure 1.12. Enhancer *Cdx2*NSE et construction du transgène. (A) Patron d'expression de l'enhancer NSE en amont du promoteur minimal Hsp68 et du gène rapporteur LacZ chez des souris transgéniques à E.9.5 (Wang et Shashikant, 2007). NT: tube neural; Me: mésoderme; So; somites. (B) Schéma représentatif de la construction finale à microinjecter après digestion NheI/PvuII.

L'hypothèse de fonctions neurales a été grandement renforcée par une étude récente démontrant le rôle de médiateur des protéines Cdx entre les signaux de postériorisation Wnt et la régulation du gène *Pax3* (Sanchez-Ferras et al., 2012). Les protéines Cdx sont en effet capables de réguler l'expression de *Pax3* par fixation directe sur son promoteur proximal (Natoli et al., 1997; Sanchez-Ferras et al., 2012). Plus précisément, la régulation se fait au niveau d'enhancers conservés dans l'évolution appelés NCE1 et NCE2 pour "neural crest element" (Milewski et al., 2004; Pruitt et al., 2004). Un autre enhancer NCE est situé dans l'intron 4 du gène *Pax3* et confère un patron d'expression similaire à NCE1 et NCE2 (Degenhardt et al., 2010).

Ce nouvel enhancer intronique que nous appellerons NCE3 semble fonctionnellement redondant avec les enhancers proximaux NCE1 et NCE2 pour permettre l'expression neurale de *Pax3* (Figure 1.13). Cela pourrait donc signifier

que les protéines Cdx seraient également capables de réguler l'expression neurale de *Pax3* via cet enhancer intronique. Le facteur de transcription Pax3 est en effet essentiel pour la fermeture du tube neurale et pour l'induction et la maintenance des cellules de la crête neurale (Meulemans et Bronner-Fraser, 2004 ; Monsoro-Burq et al., 2005 ; Wang et al., 2011) ce qui suggère que les protéines Cdx seraient essentielles pour la réalisation de ces fonctions dans la partie postérieure de l'embryon.

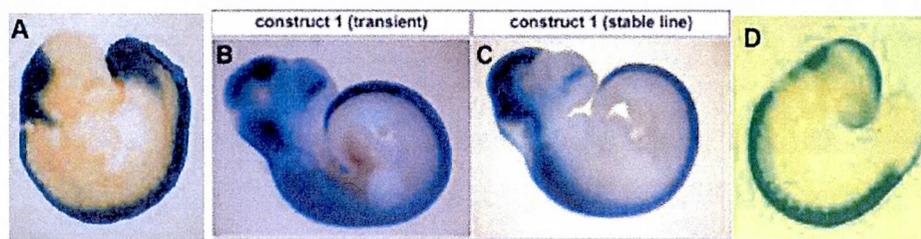


Figure 1.13. Différents patrons d'expression de *Pax3*. (A) Patron d'expression du promoteur proximal de *Pax3* (*Pax3p* 1,6kpb) avec le gène rapporteur *LacZ* chez des souris transgéniques au jour embryonnaire 8.5 (Natoli et al., 1997). (B) Patron d'expression de l'enhancer intronique NCE3 en amont du promoteur minimal *Hsp68* et du gène rapporteur *LacZ* à E.10.5 (Dagenhardt et al., 2010). (C) Patron d'expression de l'enhancer intronique NCE3 en amont du promoteur minimal *Hsp68* et du gène rapporteur *LacZ* à E.10.5 (Dagenhardt et al., 2010). (D) Hybridation *in situ* de l'expression de *Pax3* au jour embryonnaire 8.5 (laboratoire Dr.Pilon, UQAM)

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

2.1 Hypothèses de travail

2.1.1 L'enhancer intronique *Cdx2*NSE du gène *Cdx2* permet une expression spécifique au neuroectoderme postérieur *in vivo*.

2.1.2 L'expression neurale de *Cdx2* est contrôlée par les voies de signalisation Wnt canonique, FGF et BMP.

2.1.3 Les protéines Cdx sont capables de réguler l'expression de *Pax3* via différents enhancers conservés dans l'évolution et fonctionnellement redondants.

2.2 Objectifs de la maîtrise

2.2.1 *Caractérisation d'un système d'expression conditionnel spécifique au tube neural.* Utilisation d'une lignée transgénique murine permettant une induction spécifique au tube neural via la technologie Cre-LoxP.

2.2.2 *Caractérisation des voies de signalisation contrôlant l'enhancer intronique Cdx2NSE.* Des transfections transitoires et leur analyse par tests luciférase seront utilisées pour la mise en évidence de cette régulation.

2.2.3 *Caractérisation moléculaire de la régulation de l'enhancer intronique NCE3 de Pax3 par les protéines Cdx.* Des transfections transitoires et leur analyse par tests luciférase, retards sur gel et immunoprécipitation de chromatine seront utilisées pour la mise en évidence de cette régulation.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Clonage des constructions *Cdx2*NSE-Hsp68-Luc et NCE3-Pax3p-Luc

L'enhancer *Cdx2*NSE a été cloné par PCR comme précédemment décrit (Wang et Shashikant, 2007). De l'ADN génomique de souris FVB a été utilisé pour amplifier le fragment de 852-pb avec un oligo sens comprenant le site de restriction *Apa*I (5'-GGGCCCCGTGCTCTAAGAGCAGCATCCGTTC-3') et un oligo inverse incluant le site de restriction *Kpn*I (5'-GGTACCGAGGCAACTATCCTGACCAAGTGA-3'). Le promoteur minimal Hsp68 de 315-pb a été cloné avec un oligo sens contenant un site *Kpn*I (5'-GGTACCTTGGTACCCCTCCTCCGGCT-3') et un oligo inverse contenant un site *Bgl*II 5'- AGATCTTTAGATCTGGCGCCGCGCTC -3'). L'enhancer NCE3 a été cloné par PCR à partir d'ADN génomique de souris FVB pour amplifier le fragment de 961-pb grâce à un oligo sens incluant le site *Bam*HI (5'-GGATCCGAGGGGATGTGCTATTTGAG-3') et un oligo inverse contenant le site *Hind*III (5'-AAGCTTGTGTATTACCTAGTCCATTTG-3'). Enfin, le promoteur minimal de *Pax3* de 144-pb a été cloné depuis le même ADN avec un oligos sens incluant le site *Hind*III (5'-AAGCTTTGGGTGAAAGAACTAATAAATGC-3') et un oligo inverse contenant le site *Xho*I (5'-CTCGAGGCTACTGGCAAAGGTGCTCAC-3'). Toutes les amplifications ont été réalisées avec la trousse Platinum DNA polymerase (Invitrogen) en accord avec les instructions du manufacturier. Les produits de PCR ont été clonés dans le vecteur pGEMT-easy (Promega) et vérifiés par séquençage. Les enzymes de restrictions contenues dans les oligos ont été

utilisés pour le clonage final dans le vecteur d'expression du gène de la luciférase pXP2. Les vecteurs finaux d'expression de la luciférase *Cdx2*NSE-Hsp68-Luc et NCE3-Pax3p-Luc ont été ainsi générés.

3.2 Culture et transfection cellulaire

La lignée cellulaire Neuro2A a été utilisée pour l'ensemble de nos essais luciférase. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture EMEM supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin standard et d'un mélange antibiotique-antimicotique (Wisent Bioproducts). Cette lignée de cellules adhérentes est maintenue dans des pétri de 100 mm de diamètre à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules sont décollées avec 1 mL de trypsine 0.05% (Wisent Bioproducts) et $8 \cdot 10^4$ cellules par puits sont déposées dans des plaques 24 puits. Un triplicata est utilisé pour chaque condition. Deux heures après la mise en plaque, les ADN sont transfectés avec l'agent de transfection GeneJuice en suivant le protocole du manufacturier (Novagen). Une quantité fixe de 125 ng d'ADN a été transfectée pour chaque puits et un plasmide d'expression de la GFP a été utilisé pour compléter à la quantité requise. Les essais luciférase sont réalisés 48H post-transfection.

3.3 Essai luciférase

48H après transfection, le milieu de culture est aspirée et les cellules lavées avec du PBS. Les cellules sont ensuite lysées avec 100 μ L de tampon de lyse (Tableau 1) pendant 20 minutes sous agitation lente. 20 μ l de lysat cellulaire sont récupérés de chaque puits en excluant tout amas cellulaire puis ajoutés dans un tube de culture contenant 100 μ L de tampon d'essai luciférase à 4°C (Tableau 3.1). 50 μ L de D-luciférine à 0,3 mg/mL (Fisher), substrat de la luciférase, sont ajoutés au dernier moment pour chaque tube puis après 5 secondes de vortex la luminescence est analysée dans un luminomètre Lumat LB9507 (EG&G Berthold).

tampon de lyse	5 mL (2 plaques 24 puits)	tampon d'essai luciférase	5 mL (2 plaques 24 puits)	tampon A	500 mL
H ₂ O	4 mL	tampon A	4,89 mL	glycylglycine 1M	12,5 mL
TrisHCl 1M pH8,0	0,5 mL	ATP 100mM	100 μ L	MgSO ₄ 1M	7,5 mL
NP-40 10%	0,5 mL	DTT 1m	10 μ L	KPO ₄ 1M pH 7,8	7,5 mL
DTT 1M	5 μ L			EGTA 0,2M pH 7,8	10 mL
				H ₂ O	462,5 mL

Tableau 3.1. Composants des tampons utilisés dans le test luciférase. Un essai luciférase utilise un tampon de lyse pour lyser les cellules et permettre la présence de la luciférase dans le lysat cellulaire. Le tampon d'essai luciférase va permettre à la luciférase de dégrader son substrat et ainsi de générer une luminescence dont l'intensité est mesurée grâce au luminomètre.

3.4 Ecart type et test statistique

Les écarts types de chaque résultat sont représentés directement sur les figures sous forme d'une barre verticale.

Nos résultats ont été testés à l'aide du test de Student pour en déterminer leur véracité. Ce test nous permettra de valider la différence entre les valeurs observées de manière significative. La robustesse du résultat sera déterminée par la valeur p obtenue :

$p < 0,01$: différence fortement significative (représentée par ***, ### ou xxx)

$p < 0,05$: différence moyennement significative (représentée par **, ## ou xx)

$p < 0,1$: différence faiblement significative (représentée par *, # ou x)

$p > 0,1$: différence non significative (non représentée)

CHAPITRE IV

GÉNÉRATION D'UN NOUVEAU MODÈLE *IN VIVO* POUR EXPRESSION CONDITIONNELLE DANS LE NEUROECTODERME CAUDAL

Characterization of a novel transgenic mouse line expressing Cre recombinase under the control of the *Cdx2* neural specific enhancer

Baptiste Coutaud and Nicolas Pilon*

Molecular Genetics of Development Laboratory, Department of Biological Sciences
and BioMed Research Center, Faculty of Sciences, University of Quebec at
Montreal (UQAM)

***To whom correspondence should be addressed:** Nicolas Pilon, Department of
Biological Sciences, University of Quebec at Montreal (UQAM), 141 President-
Kennedy Ave, Montreal, PQ, Canada, H2X 3Y7; Tel.: 514-987-3000 x3342; Fax:
514-987-4647; Email: pilon.nicolas@uqam.ca

Running title: A Cre-driver line for the caudal neuroectoderm

Key words: Cre recombinase, *Cdx2*, neural specific enhancer, posterior neural plate,
neural tube, neural crest cells.

Cet article fut accepté dans la revue scientifique *Genesis :The journal of genetics
and development* et publié en ligne le 30 août 2013. Il est présentement en attente de
publication dans une édition papier de cette même revue.

ABSTRACT

Several genetically-modified mouse models have been generated in order to drive expression of the Cre recombinase in the neuroectoderm. However, none of them specifically targets the posterior neural plate during neurulation. To fill this gap, we have generated a new transgenic mouse line in which Cre expression is controlled by a neural specific enhancer (NSE) from the *Caudal-related homeobox 2 (Cdx2)* locus. Analyses of Cre activity via breeding with R26R-YFP reporter mice have indicated that the *Cdx2*NSE-Cre mouse line allows for recombination of LoxP sites in most cells of the posterior neural plate as soon as from the head fold stage. Detailed examination of double-transgenic embryos has revealed that this novel Cre-driver line allows targeting the entire posterior neural tube with an anterior limit in the caudal hindbrain. Of note, the *Cdx2*NSE regulatory sequences direct Cre expression along the whole dorso-ventral axis (including pre-migratory neural crest cells) and, accordingly, YFP fluorescence has been also observed in multiple non-cranial neural crest derivatives of double-transgenic embryos. Therefore, we believe that the *Cdx2*NSE-Cre mouse line represents an important novel genetic tool for the study of early events occurring in the caudal neuroectoderm during the formation of both the central and the peripheral nervous systems.

INTRODUCTION

In vertebrates, early development of the nervous system involves the concerted action of numerous tightly regulated processes in order to properly shape and pattern the neuroectoderm. Formation of a closed neural tube (NT) has to be coordinated with acquisition of positional identity (along both the antero-posterior and dorso-ventral axes) as well as with posterior elongation and induction of neural crest cells (NCC). Such synchronization is required for establishing proper interconnections between the NT-derived central nervous system and the NCC-derived peripheral nervous system. It is also noteworthy that the multipotent and migratory NCC generate in addition multiple non-neural derivatives such as melanocytes, cranio-facial chondrocytes and a subset of conotruncal heart cells, to name a few. Abnormal early nervous system development can thus result in NT defects (such as *spina bifida* and craniorachischisis) and/or neurocristopathies (NCC-associated congenital anomalies), which are amongst the most prevalent group of human congenital malformations (Bolande, 1997; Copp *et al.*, 2003; Nye *et al.*, 1999). This clinical relevance warrants a better understanding of nervous system ontogeny and the mouse has proved to be a very useful animal model in this regard.

Several mouse models based on the Cre-LoxP system have been generated to study early development of the nervous system. Genetically-modified mouse models have been developed for expressing the Cre recombinase in either the whole NT (e.g. *Nestin*-Cre or *Sox1*-Cre) (Dubois *et al.*, 2006; Takashima *et al.*, 2007) or more restricted domains along the dorso-ventral axis (e.g. *Pax3*-Cre or *Ngn1*-Cre) (Li *et al.*, 2000; Quinones *et al.*, 2010). Some other Cre-driver lines with restricted expression along the antero-posterior axis have also been generated (e.g. *Foxg1*-Cre or *Krox20*-Cre) (Hebert and McConnell, 2000; Voiculescu *et al.*, 2001). However, none of the currently existing models directs Cre expression specifically in the posterior neural plate (i.e. the prospective spinal cord territory) at the onset of neurulation.

Antero-posterior patterning of the neuroectoderm is achieved by transformation of a default anterior fate in response to posteriorizing signals. Such posteriorizing cues consist of FGF (fibroblast growth factor), RA (retinoic acid) and canonical Wnt (*Wingless/int1-related*) signaling pathways, which together regulate *Hox* gene expression via both direct and indirect means (Forlani *et al.*, 2003; Kudoh *et al.*, 2002; Lumsden and Krumlauf, 1996). *Hox* gene products will then form the so-called Hox code, which is involved in the conversion of antero-posterior positional information into morphological outcomes (Deschamps and van Nes, 2005). Members of the Cdx (Caudal-related homeobox) transcription factors (*Cdx1/2/4*) are also known to play a prominent role in this regulatory cascade by acting as intermediaries between posteriorizing signals and *Hox* genes (Lohnes, 2003). Murine *Cdx* genes are expressed in all three germ layers of the caudal embryo during gastrulation and neurulation (Beck *et al.*, 1995; Gamer and Wright, 1993; Meyer and Gruss, 1993), being notably under the direct regulation of canonical Wnt signals (Pilon *et al.*, 2006; Pilon *et al.*, 2007; Sanchez-Ferras *et al.*, 2012). The most anterior limit of *Cdx* expression is found in the neuroectoderm, being located around the prospective hindbrain/spinal cord boundary for *Cdx1* and *Cdx2* (Sturgeon *et al.*, 2011).

Functional analyses of cis-regulatory elements have revealed that *Cdx* gene expression is controlled by multiple modular enhancers located in upstream, downstream or intronic regions (Benahmed *et al.*, 2008; Gaunt *et al.*, 2003; Gaunt *et al.*, 2005; Lickert and Kemler, 2002; Rankin *et al.*, 2004; Wang and Shashikant, 2007). Interestingly, one of these studies identified a neural specific enhancer (NSE) located in *Cdx2* intron 1 (Wang and Shashikant, 2007). We thus took advantage of this previous work and use a 1 kb fragment containing this NSE in order to generate a mouse line that specifically drives Cre expression in the caudal neuroectoderm. Characterization of this mouse line – called *Cdx2*NSE-Cre – revealed that it allows recombination of LoxP sites in the caudal neuroectoderm, targeting both the NT and NCC posterior to the hindbrain.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to generate a Cre-driver mouse line that specifically targets the posterior neural plate, we first cloned a 852bp fragment from *Cdx2* intron 1 previously reported to contain a neural specific enhancer (NSE) (Wang and Shashikant, 2007). This fragment was then subcloned upstream of a Cre recombinase expression cassette consisting of the *Hsp68* minimal promoter, Cre open reading frame and SV40 polyA sequences. Standard oocyte microinjections of this construct yielded multiple transgenic animals from which only a single male was used for establishing the *Cdx2*NSE-Cre transgenic line. Both heterozygous and homozygous animals are viable, fertile and do not show any overt morphological defects nor any abnormal behavior.

Cre recombinase expression and activity was monitored by breeding *Cdx2*NSE-Cre animals with R26R-YFP reporter mice. In this particular background, Cre-dependent expression of YFP (yellow fluorescent protein) is under the control of the ubiquitous ROSA26 promoter and thus occurs in cells expressing Cre as well as in their progeny (Srinivas *et al.*, 2001). Using this strategy, the first sign of Cre recombinase activity was traced back to the head fold stage, at which time a significant number of cells exhibited YFP fluorescence in the caudal neuroectoderm of double transgenic embryos (Fig. 1A-B'). By the 4-somite stage, robust Cre activity was detected in almost all cells of the posterior neural plate (Fig. 1C, C'). At this stage, the anterior limit of YFP fluorescence was found extending in the forming neural tube (NT) as far as in the prospective caudal hindbrain territory. As expected, transverse sections of the tailbud showed that YFP fluorescence was restricted to neural cells (Fig. 1D, D').

At embryonic day (E) 8.5, YFP fluorescence was still observed in the whole posterior neural plate and also in the closed NT with an anterior limit located between the first and second somite (Fig. 2A, A'). Transverse sections at trunk level revealed that YFP-labeled cells were exclusively neural, being found along the whole dorso-ventral axis of the NT (Fig. 2B-B'). However, more caudally,

transverse sections of the tailbud suggested an expansion of Cre activity in a subset of presumptive mesoderm cells (Fig. 2C-E'). Immunofluorescent co-labeling with an antibody against the neural marker Sox2 was thus used to confirm the non-neural identity of these cells (Fig. 3). This analysis clearly revealed that a sub-population of YFP-positive cells was indeed also Sox2-negative at the most caudal end of *Cdx2*NSE-Cre::R26R-YFP embryos (Fig. 3D-E'').

At E9.5, the pattern of YFP fluorescence was consistent with observations made at previous stages. While YFP-labeled cells were exclusively neural in the caudal hindbrain and anterior spinal cord regions, a subset of mesoderm cells were also YFP-positive more posteriorly (Fig. 4). These YFP-labeled mesoderm cells were displayed along a rostro-caudal gradient in the most caudal quarter of the embryo, culminating in the tailbud. In addition, observations at this stage revealed that *Cdx2*NSE-Cre allows targeting migratory neural crest cells (NCC) (Fig. 4D'). Given that *Cdx2* is not expressed in these cells, this most likely reflected a cell lineage effect subsequent to Cre activity in the pre-migratory NCC population – which is located in the dorsal NT.

Characterization at later stages (between E11.5 and E15.5) further demonstrated that *Cdx2*NSE-Cre allows targeting every structure derived or colonized by non-cranial NCC (Fig. 5). Indeed, in addition to the NT, YFP-labeled cells were found in derivatives of trunk (dorsal root ganglia, peripheral nerves, sympathetic ganglia and melanoblasts; Fig. 5A, A' and F), cardiac (outflow tract; Fig. 5E) and vagal (enteric neural progenitors; Fig. 5B-D') NCC. At these later stages, the rostro-caudal gradient of YFP-labeled cells in the mesoderm was found spreading from around the posterior limb down to the tip of the tail (data not shown).

On the other hand, it is also noteworthy that some *Cdx2*NSE-Cre::R26R-YFP double transgenic embryos exhibited non-specific widespread YFP fluorescence in a genetic background-dependent manner (data not shown). Interestingly, we noticed that this effect occurred much less frequently when the FVB background

contribution is increased. With a 50% FVB contribution, it was observed in 17% of fluorescent embryos whereas with a 87.5% FVB contribution, it was not observed. This outcome most likely reflects the fact that the regulatory sequences (NSE and *Hsp68* promoter) used to generate the *Cdx2*NSE-Cre transgene were cloned from FVB genomic DNA. Consequently, it should be noted that a *Cdx2*NSE-Cre mouse line having a nearly pure FVB background (backcrossed for at least 5 generations) will be available to the scientific community.

Taken together, our analyses have demonstrated that the *Cdx2*NSE-Cre mouse line targets the whole posterior neuroectoderm (both NT and NCC) with the caudal hindbrain as anterior limit. However, we have also found that this transgene is not fully neural-specific since it is also active in a subset of mesoderm cells of the most caudal quarter of the embryo. Given that such activity has been also observed with multiple transgenic founders (5 out of 8; data not shown), this suggests that it is a true inherent property of the cloned sequences. Such hypothesis is supported by the fact that in the original description of the *Cdx2* NSE, E9.5 transient transgenic embryos did not only display reporter gene expression in the NT but apparently also in the whole tailbud (Wang and Shashikant, 2007). Therefore, the YFP labeling of mesoderm cells in *Cdx2*NSE-Cre::R26R-YFP double transgenic embryos was most likely indicative of a cell lineage effect resulting from Cre activity in tailbud mesoderm precursors. Further functional dissection of the NSE sequences might thus eventually lead to an improved version (i.e. fully neural specific) of the *Cdx2*NSE-Cre transgene. Nonetheless, we believe that the current *Cdx2*NSE-Cre mouse model represents a valuable novel genetic tool for the study of early NT and NCC development specifically in the caudal embryo.

MATERIALS AND METHODS

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 0512-R3-648-0513).

Construction of the *Cdx2*NSE-Cre transgene

The neural specific enhancer was cloned by PCR as previously described (Wang et Shashikant, 2007). Genomic DNA from a FVB mouse was used to amplify a 852-bp fragment using a forward primer containing a *Apa*I site (5'-GGGCCCGTGCTCTAAGAGCAGCATCCGTTTC-3') and a reverse primer bearing a *Kpn*I site (5'-GGTACCGAGGCAACTATCCTGACCAAGTGA-3'). The minimal *Hsp68* promoter (315-bp) was similarly amplified with a forward primer containing a *Kpn*I site (5'-GGTACCTTGGTACCCCTCTCCGGCT-3') and a reverse primer containing a *Bgl*II site (5'-AGATCTTTAGATCTGGCGCCGCGCTC-3'). Cre recombinase coding sequences (1032pb) were amplified from another plasmid (Pilon *et al.*, 2008) using a forward primer bearing a *Sac*I site (5'-GAGCTCATGTCCAATTTACTGACCGTACAC-3') and a reverse primer containing a *Spe*I site (5'-ACTAGTCTAATCGCCATCTTCCAGC-3'). All amplifications were done using the Platinum Taq DNA polymerase kit (Invitrogen) in accordance with manufacturer's instructions. PCR products were cloned in pGEMT-easy vector (Promega) and verified by sequencing. Restriction sites contained in primers were then used to assemble the *Cdx2*NSE-*Hsp68*p-Cre sequences in a vector containing SV40 polyA sequences (pIRES-EGFP2; Clontech). The *Cdx2*NSE-*Hsp68*p-Cre-SV40pA transgene was finally excised

with *NheI* and *PvuII* to obtain the 3150-bp fragment that was used for microinjections.

Generation and analysis of the *Cdx2*NSE-Cre transgenic mouse line

*Cdx2*NSE-Cre transgene DNA was microinjected in B6C3 oocytes in accordance with standard methods. Offspring was screened by PCR-based genotyping of tail DNA using specific Cre recombinase primers (forward: 5'-GATGAGGTTTCGCAAGAACCTGATG-3' and reverse: 5'-AACAGCATTGCTGTCACTTGGTCG-3'). Thirteen F0 transgenic animals were identified, of which only males (eight) were tested for Cre activity as described below. A single male (R337) was then kept to generate the *Cdx2*NSE-Cre mouse line via breeding with a C57BL/6 female. *Cdx2*NSE-Cre transgenic animals are available upon request.

Cre recombinase activity was evaluated by crossing F1 *Cdx2*NSE-Cre mice with R26R-YFP animals (initially obtained from Frank Costantini and then maintained on a FVB background) as previously described (Pilon *et al.*, 2008; Srinivas *et al.*, 2001). Timed pregnancies were set up using standard vaginal plug detection, noon of the day of plug detection being considered as E0.5.

Microscopy and imaging

Embryos were dissected and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. Fixation time was adjusted in accordance with embryonic stages. For transverse sections, embryos were embedded in 3% agarose and 100 μ m transverse sections were realized using a vibrating blade microtome Microm HM 650V (Thermo Scientific).

Bright field and YFP images were obtained with a Leica DFC 495 camera mounted on a Leica M205 FA microscope (Leica Microsystems). Exposure time

was adjusted for optimal imaging, and kept constant throughout the experimental time course.

Immunostaining

Following dissection and fixation, whole embryos were first incubated in blocking solution (10% FBS and 0,1% triton in PBS) for 2h at room temperature. Embryos were then incubated overnight at 4°C with goat anti-SOX2 primary antibody (R&D Systems, #AF2018) diluted 1:200 in blocking solution. After washing, embryos were incubated 2h at room temperature with bovine anti-goat Alexa Fluor 647 secondary antibody diluted 1:500 in blocking solution (Jackson ImmunoResearch). After final washing, transverse sections were realized as described above and fluorescence from both YFP and immunostaining was captured with a laser-scanning confocal microscope (Nikon AIR).

REFERENCES

- Beck F, Erler T, Russell A, James R. 1995. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 204: 219-227.
- Benahmed F, Gross I, Gaunt SJ, Beck F, Jehan F, Domon-Dell C, Martin E, Kedinger M, Freund JN, Duluc I. 2008. Multiple regulatory regions control the complex expression pattern of the mouse Cdx2 homeobox gene. *Gastroenterology* 135: 1238-1247, 1247 e1231-1233.
- Bolande RP. 1997. Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med* 17: 1-25.
- Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4: 784-793.
- Deschamps J, van Nes J. 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132: 2931-2942.
- Dubois NC, Hofmann D, Kaloulis K, Bishop JM, Trumpp A. 2006. Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. *Genesis* 44: 355-360.

- Forlani S, Lawson KA, Deschamps J. 2003. Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. *Development* 130: 3807-3819.
- Gamer LW, Wright CV. 1993. Murine Cdx-4 bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43: 71-81.
- Gaunt SJ, Drage D, Cockley A. 2003. Vertebrate caudal gene expression gradients investigated by use of chick *cdx-A/lacZ* and mouse *cdx-1/lacZ* reporters in transgenic mouse embryos: evidence for an intron enhancer. *Mech Dev* 120: 573-586.
- Gaunt SJ, Drage D, Trubshaw RC. 2005. *cdx4/lacZ* and *cdx2/lacZ* protein gradients formed by decay during gastrulation in the mouse. *Int J Dev Biol* 49: 901-908.
- Hebert JM, McConnell SK. 2000. Targeting of cre to the *Foxg1* (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev Biol* 222: 296-306.
- Kudoh T, Wilson SW, Dawid IB. 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* 129: 4335-4346.
- Li J, Chen F, Epstein JA. 2000. Neural crest expression of Cre recombinase directed by the proximal *Pax3* promoter in transgenic mice. *Genesis* 26: 162-164.
- Lickert H, Kemler R. 2002. Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early *Cdx1* gene expression in the mouse. *Dev Dyn* 225: 216-220.
- Lohnes D. 2003. The *Cdx1* homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* 25: 971-980.
- Lumsden A, Krumlauf R. 1996. Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274: 1109-1115.
- Meyer BI, Gruss P. 1993. Mouse *Cdx-1* expression during gastrulation. *Development* 117: 191-203.
- Nye JS, McLone DG, Charrow J, Hayes EA. 1999. Neural crest anomaly syndromes in children with spina bifida. *Teratology* 60: 179-189.
- Pilon N, Oh K, Sylvestre JR, Bouchard N, Savory J, Lohnes D. 2006. *Cdx4* is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Dev Biol* 289: 55-63.
- Pilon N, Oh K, Sylvestre JR, Savory JG, Lohnes D. 2007. Wnt signaling is a key mediator of *Cdx1* expression in vivo. *Development* 134: 2315-2323.
- Pilon N, Raiwet D, Viger RS, Silversides DW. 2008. Novel pre- and post-gastrulation expression of *Gata4* within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Dev Dyn* 237: 1133-1143.
- Quinones HI, Savage TK, Battiste J, Johnson JE. 2010. Neurogenin 1 (*Neurog1*) expression in the ventral neural tube is mediated by a distinct enhancer and preferentially marks ventral interneuron lineages. *Dev Biol* 340: 283-292.
- Rankin EB, Xu W, Silberg DG, Suh E. 2004. Putative intestine-specific enhancers located in 5' sequence of the *CDX1* gene regulate *CDX1* expression in the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G872-880.

- Sanchez-Ferras O, Coutaud B, Djavanbakht Samani T, Tremblay I, Souchkova O, Pilon N. 2012. Caudal-related homeobox (Cdx) protein-dependent integration of canonical Wnt signaling on paired-box 3 (Pax3) neural crest enhancer. *J Biol Chem* 287: 16623-16635.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1: 4.
- Sturgeon K, Kaneko T, Biemann M, Gauthier A, Chawengsaksophak K, Cordes SP. 2011. Cdx1 refines positional identity of the vertebrate hindbrain by directly repressing *Mafk* expression. *Development* 138: 65-74.
- Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129: 1377-1388.
- Voiculescu O, Taillebourg E, Pujades C, Kress C, Buart S, Charnay P, Schneider-Maunoury S. 2001. Hindbrain patterning: *Krox20* couples segmentation and specification of regional identity. *Development* 128: 4967-4978.
- Wang WC, Shashikant CS. 2007. Evidence for positive and negative regulation of the mouse *Cdx2* gene. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308: 308-321.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Denis Flipo (UQAM) for assistance with the confocal analyses as well as Qinzhang Zhu (IRCM) for microinjections. This work was supported by a grant from the Canadian Institute for Health Research to NP (CIHR grant number MOP-111130). BC is supported by a UQAM scholarship and NP by a career award (chercheur-boursier Junior 2) from the Fonds de la Recherche en Santé Québec – Santé (FRQS).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of *Cdx2*NSE-Cre at the onset of neurulation.

Analyses of embryos obtained from crosses between *Cdx2*NSE-Cre and R26R-YFP reporter mice at head fold (A-B') and 4-somite (C-D') stages. Images were taken under bright field (A, B, C, D) or YFP detection mode (A', B', C', D').

Lateral (A,B), dorsal (C-F) and transverse (G-H) views reveal that YFP fluorescence is restricted to the caudal neuroectoderm. The dashed line in C-C' indicates the level at which the cross section shown in D-D' was made.

Abbreviations: P, posterior; A, anterior; PNP, posterior neural plate; NT, neural tube.

Figure 2: Characterization of *Cdx2*NSE-Cre during early neurulation.

Detailed analysis of a 7-somite stage embryo obtained from a cross between *Cdx2*NSE-Cre and R26R-YFP reporter mice. Images were taken under bright field (A, B, C, D, E) or YFP detection mode (A', B', C', D', E'). YFP fluorescence is observed in the posterior neural plate (PNP) and the closed neural tube (NT) with an anterior limit between the first and second somite (A-A'). The dashed lines in A-A' indicates the level at which the cross sections shown in B to E' were made. These transverse sections suggest that the neural specificity of YFP fluorescence is decreasing caudally, being also found in the presumptive mesoderm territory.

Figure 3: The *Cdx2*NSE-Cre transgene is not fully neural-specific.

Immunofluorescent detection of Sox2 in a E8.5 *Cdx2*NSE-Cre::R26R-YFP double-transgenic embryo. The dashed lines in A indicate the level at which the cross sections shown on the right were made. Confocal imaging of these transverse sections show that a subset of YFP-labeled cells (green) are not labeled by an antibody against the neural marker Sox2 (red) in the most caudal end of the

embryo, supporting the assumption that these cells are mesodermal. Note also that the number of these YFP-positive but Sox2-negative cells appears to form a gradient along the antero-posterior axis.

Figure 4: Characterization of *Cdx2*NSE-Cre during late neurulation. Analysis of E9.5 embryos obtained from crosses between *Cdx2*NSE-Cre and R26R-YFP reporter mice. Images were taken under bright field (A, B, C, D) or YFP detection mode (A', B', C', D'). Frontal (A, A') and lateral (B, B') views show YFP fluorescence in the closed neural tube (NT). Blue arrowheads point to progressive mesodermal expression in the caudal end of the embryo (A', B'). The dashed lines in B-B' indicate the level at which the cross sections shown in C to D' were made. Note that while the tailbud is almost completely labeled with YFP fluorescence (C, C'), this labeling is neuroectoderm-specific in the trunk (D, D'). Note also that YFP fluorescence is observed in migratory neural crest cells (NCC) of the trunk (D').

Figure 5: Characterization of *Cdx2*NSE-Cre activity in the neural crest lineage. Analyses of E11.5 (A, A'), E13.5 (B-E) and E15.5 (F) embryos obtained from crosses between *Cdx2*NSE-Cre and R26R-YFP reporter mice. Bright field (A, D), YFP fluorescence (A', B, C, D', F) and composite images (E) are shown. Transverse views of E11.5 embryos at trunk level (A, A') indicate that YFP is expressed in the neural tube (NT) as well as multiple derivatives of neural crest cells such as melanoblasts (M), dorsal root ganglia (DRG), peripheral nerves (PN) and sympathetic ganglia (SG). In E13.5 embryos, YFP-labeled neural crest cells are also observed colonizing the cardiac outflow tract (E) as well as the gut (B-D'). The dashed line in C indicates the level at which the cross section shown in D-D' was made; this section shows that YFP fluorescence marks enteric neural precursors (ENP). In E15.5 embryos, YFP-labeled melanoblasts can be observed spreading over the whole body except the head (F).

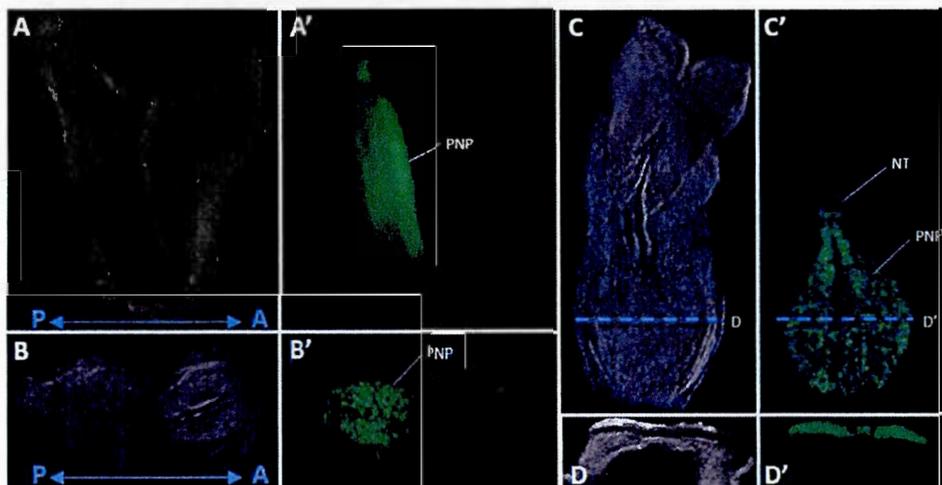


FIGURE 1

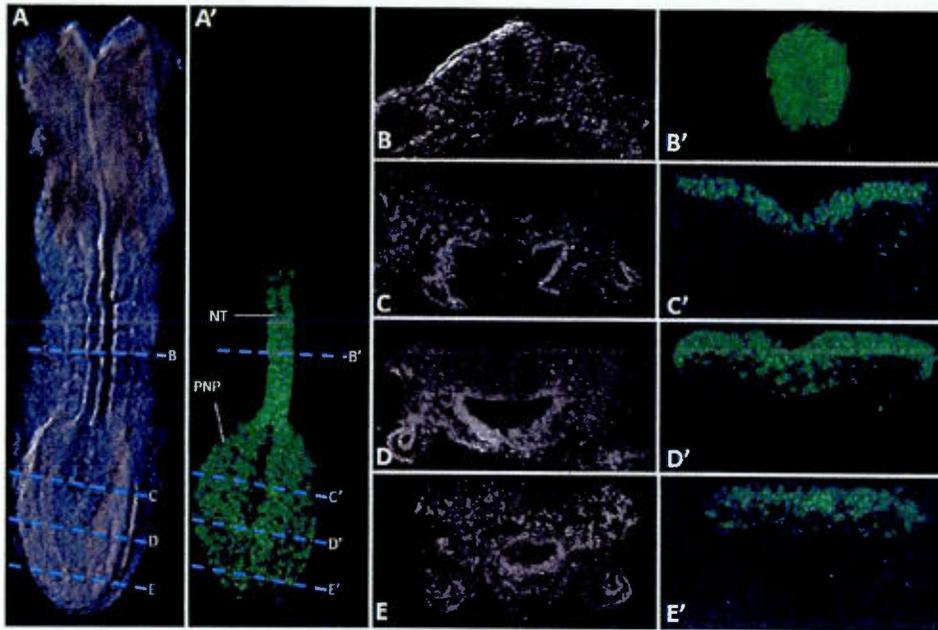


FIGURE 2

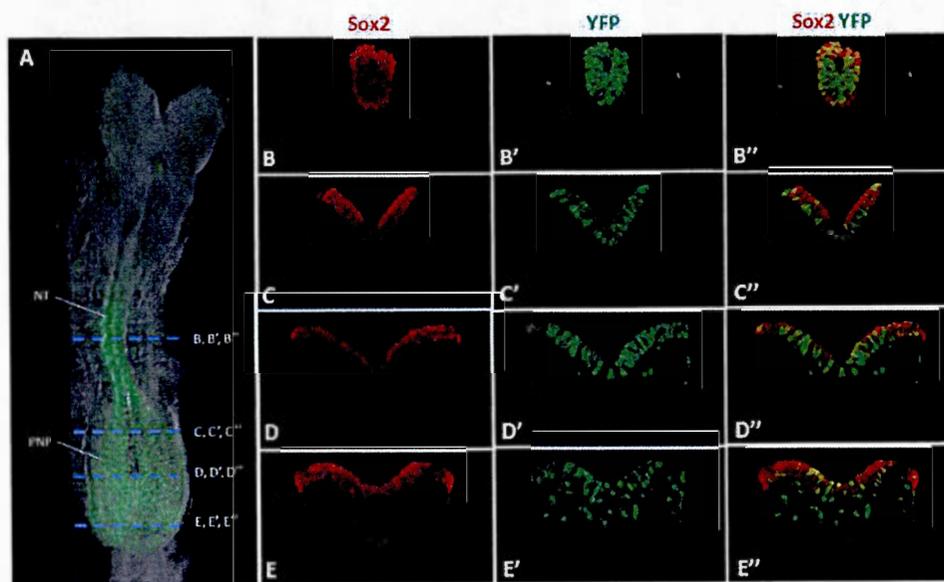


FIGURE 3

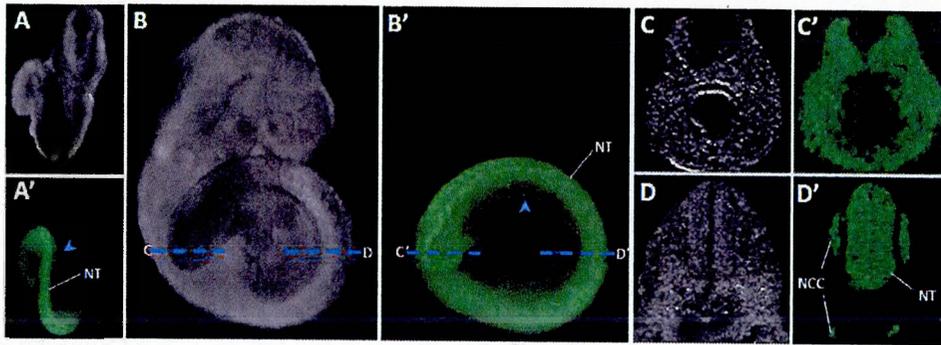


FIGURE 4

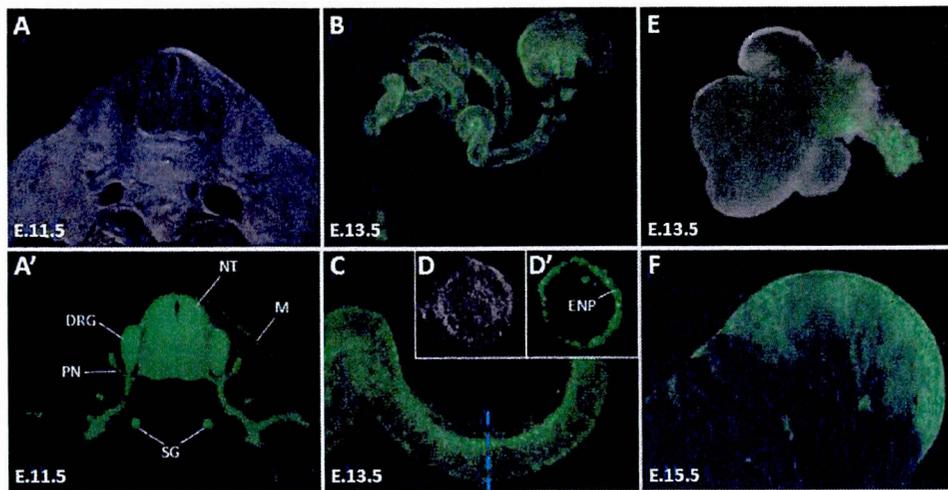


FIGURE 5

CHAPITRE V

CARACTÉRISATION DES VOIES DE SIGNALISATION CONTRÔLANT L'ENHANCER INTRONIQUE *CDX2*NSE

5.1 Mise en place de l'expérience

Afin de déterminer les voies de signalisation responsable de l'expression neurale de *Cdx2*, l'enhancer intronique *Cdx2*NSE de 852-pb utilisé précédemment est cloné en amont du promoteur minimal *Hsp68* dans un vecteur d'expression du gène de la luciférase. Les deux orientations de l'enhancer ont été testées car il pourrait être bi-directionnel, ou bien être opérationnel en sens inverse. Nous avons utilisé pour cela la lignée cellulaire Neuro2A qui est dérivée d'un neuroblastome murin. Ces cellules possèdent un phénotype de cellules progénitrices de la crête neurale. La sécrétion autocrine du ligand *Wnt7* permet l'activation constitutive de la voie *Wnt* canonique (Colombes et al., 2008 ; Shi et al., 2010). Ces cellules expriment donc les trois protéines *Cdx* ainsi qu'une grande partie des facteurs neuraux tels que *Pax3*, *Sox9* et *Sox10* (Liu et al., 1999 ; Sanchez-Ferras et al., 2012).

L'analyse bio-informatique de la séquence de *Cdx2*NSE nous permet d'identifier plusieurs sites potentiels de fixation comme étant des cibles des voies de signalisation impliquées dans le développement neural. Nous retrouvons 8 sites potentiels de fixation *Lef/Tcf*, cibles de la voie *Wnt* canonique, 3 sites potentiels de fixation des protéines *Smad1/5* que reconnaissent la voie *BMP* ou encore 11 sites potentiels de fixation des protéines *Ets1*, *Maf* ou *AP-1*, effecteurs potentiels de la voie *FGF* (Bertrand et al., 2003). Pour mimer *in vitro* une possible régulation de *Cdx2*NSE par ces voies, nous co-transfectons notre vecteur *Cdx2*NSE-*Hsp68*-

Luc avec des plasmides qui permettront la surexpression de différentes protéines. Un vecteur de surexpression de Smad5 servira pour visualiser le rôle potentiel de la voie BMP (Pasero et al., 2012). Nous utiliserons également un plasmide codant pour une protéine de fusion constituée du domaine de fixation à l'ADN de Lef-1 et du domaine de transactivation de la β -caténine (Lef δ N β CTA), ce qui mimera une induction constitutive de la voie Wnt canonique (Vleminckx et al., 1999). Sur le même principe, nous utiliserons deux plasmides codant respectivement pour les récepteurs FGFR2 et FGFR3 ayant un point de mutation (FGFR2* S354C et FGFR3* K650E) leur permettant d'être sans cesse phosphorylés et donc de mimer une induction constitutive de la voie FGF (Park et al., 1995 ; Krejci et al., 2007).

Les résultats présentés correspondent à la compilation de 4 expériences indépendantes. Chaque essai luciférase comprenait un contrôle positif pour s'assurer de l'efficacité du test et chaque condition a été réalisée en triplicata (Tableau 5.1). Les valeurs obtenues correspondent au rapport d'induction entre les conditions sans et avec plasmide de surexpression ont été normalisé avec le rapport d'induction du vecteur vide (sans enhancer). La protéine de fusion Lef δ N β CTA a servi de contrôle positif en co-transfection avec le plasmide pGL-OT qui contient plusieurs sites de fixation Lef1 en amont du gène rapporteur de la luciférase.

Vecteur vide	100 ng	Vecteur vide	100 ng
GFP	25 ng	FGFR2*	2,5 ng
		GFP	22,5 ng
Vecteur vide	100 ng	<i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc	100 ng
FGFR2*	20 ng	GFP	25 ng
GFP	5 ng		
<i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc	100 ng	<i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc	100 ng
FGFR2*	2,5 ng	FGFR2*	5 ng
GFP	22,5 ng	GFP	20 ng
<i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc	100 ng	<i>Cdx2</i> NSE-Hsp68-Luc	100 ng
FGFR2*	10 ng	FGFR2*	20 ng
GFP	15 ng	GFP	5 ng

Tableau 5.1 : exemple de plaque 24 puits. Chaque condition correspond à un triplicata et toutes les conditions pour un même plasmide de surexpression se font sur la même plaque. Le témoin positif est réalisé sur une plaque séparée.

5.2 Effets de la voie FGF

Les résultats de nos essais luciférase avec FGFR2* nous montrent que toutes les conditions affichent un rapport d'induction proche de 1. La surexpression de FGFR2* n'apporte aucun changement de luminescence que ce soit avec l'enhancer en sens ou en inverse (figure 5.2a). Les écarts types sont assez grands mais les témoins positifs de ces expériences ont bien marché et l'utilisation de plus de données ne change pas le résultat obtenu. La voie FGF ne semble de pas réguler l'expression de l'enhancer intronique *Cdx2NSE* via l'induction de son récepteur FGFR2.

Nos résultats avec FGFR3* nous montrent qu'avec l'enhancer en sens, aucune condition ne diffère de la normale, suggérant que la surexpression de FGFR3* n'a pas d'effet quelque soit la quantité de plasmide initiale. Les conditions avec l'enhancer en sens inverse nous donnent des résultats différents puisque chaque quantité testée induit un rapport d'induction différent de la normale (Figure 5.2b). Les quantités de 2,5 ng et de 20 ng entraîne une diminution du rapport de luminescence de 22% et 26%, respectivement. A l'opposé, les quantités de 5 ng et 10 ng induisent une augmentation du rapport de luminescence de 37% et 27%, respectivement. Nous avons déterminé grâce au test de Student que ces valeurs étaient significativement différentes. Il semblerait que la voie FGF puisse réguler l'expression de l'enhancer intronique *Cdx2NSE* via son récepteur FGFR3 mais que l'intensité du signal en aval de l'induction par le ligand soit extrêmement importante. Le maintien de cette intensité dans une fenêtre étroite permettrait une régulation à la hausse de *Cdx2NSE* alors qu'une intensité trop faible ou trop forte diminuerait son activité.

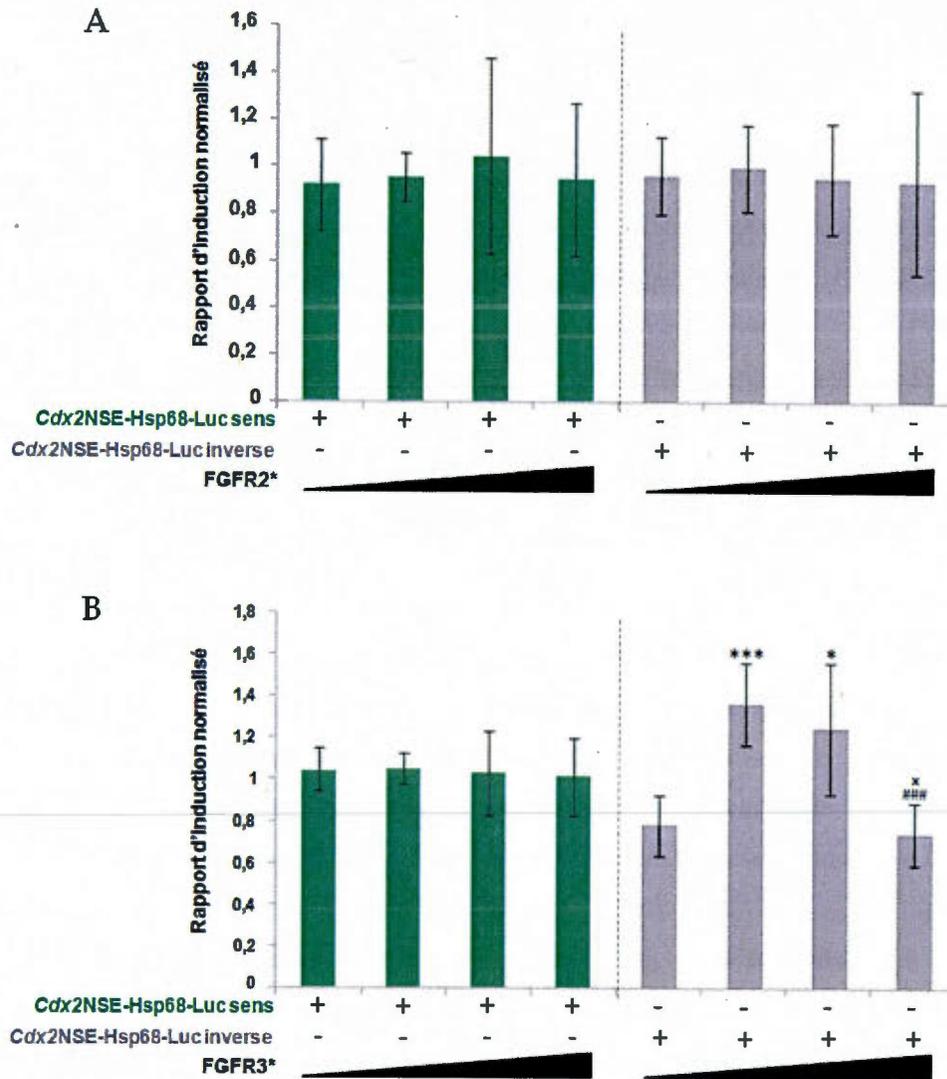


Figure 5.2 : Effets de la voie FGF sur l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE*. (A-B) Essais de co-transfections dans la lignée cellulaire Neuro2A utilisant le gène rapporteur de la luciférase. Les résultats représentent le rapport d'induction normalisé par le rapport obtenu avec le vecteur vide. Effets de l'activation constitutive du récepteur membranaire FGFR2 (A) et FGFR3 (B) sur l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE* cloné en sens (vert) et en inverse (gris). Les valeurs significativement différentes de la condition 2,5 ng sont représentées par un astérisque (*), celles différentes de la condition 5 ng sont représentées par un dièse (#) et celles différentes de la condition 10 ng par une croix (x).

Il serait intéressant d'affiner ces résultats en testant d'autres quantités de plasmide de surexpression de FGFR3*, que ce soit entre 2,5 et 20 ng pour mieux définir la transition entre activité inhibitrice et régulatrice. Tester des quantités inférieures à 2,5 ng et supérieures à 20 ng nous permettrait également de confirmer la tendance observée et de déterminer le potentiel inhibiteur de FGFR3* sur notre enhancer en sens inverse.

Nos résultats peuvent s'extrapoler au contexte *in vivo*, où les signaux FGF se retrouvent sous forme d'un gradient dans la plaque neurale postérieure allant de la ligne primitive vers les extrémités de la plaque neurale. La fenêtre d'intensité observée dans nos essais luciférase pourrait correspondre à l'intensité retrouvée de manière endogène dans la plaque neurale postérieure. La concentration de signaux FGF dans le neuroectoderme pourrait donc servir de régulateur positif de notre enhancer *Cdx2NSE*. Une intensité trop faible mimerait une localisation dans l'ectoderme non neural et une intensité trop forte pourrait correspondre par exemple à une valeur trop importante et donc non physiologique. Une autre hypothèse serait que cette intensité trop importante corresponde aux intensités retrouvées au niveau de la ligne primitive à des stades précoces de développement. Dans notre modèle murin *Cdx2NSE-Cre*, il semblerait que la fluorescence YFP soit légèrement moins répandue au niveau de cette ligne primitive aux stades E.7.5, 4-somites et 7-somites (Coutaud et Pilon 2013 ; Figure 1B', 1C' et Figure 2A').

5.3 Effets de la voie BMP

Nos résultats avec la surexpression de Smad5, un effecteur spécifique de la voie BMP, présentent un profil similaire avec l'enhancer *Cdx2NSE* en sens et en

inverse (Figure 5.3). Nous observons une diminution significative de l'activité de l'enhancer hormis pour une condition (10 ng en sens et 5 ng en inverse) où il n'y a pas de différence de luminescence avec la normale. Avec l'enhancer en sens, son activité est réduite de 29% pour la condition 5 ng et descend jusqu'à 41% pour la condition 20 ng. En inverse, son activité diminue de 32% pour 2,5 ng et descend jusqu'à 46% pour 20 ng. Il y a même une chute significative entre ces deux conditions, ce qui semble dire qu'un fort signal BMP soit un inhibiteur puissant de notre enhancer.

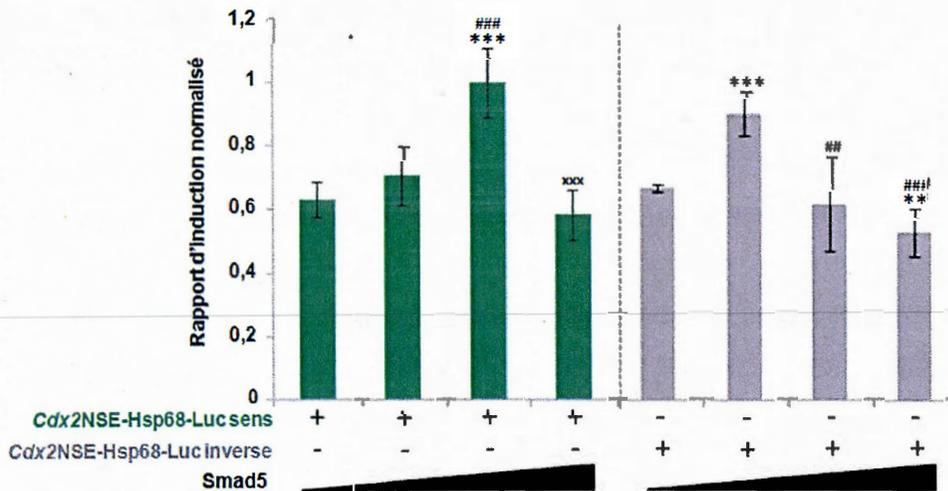


Figure 5.3. Effets de la voie BMP sur l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE*. Essais de co-transfections dans la lignée cellulaire Neuro2A utilisant le gène rapporteur de la luciférase. Les résultats représentent le rapport d'induction normalisé par le rapport obtenu avec le vecteur vide. Effets de la surexpression de l'effecteur Smad5 sur: l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE* cloné en sens (vert) et en inverse (gris). Les valeurs significativement différentes de la condition 2,5 ng sont représentées par un astérisque (*), celles différentes de la condition 5 ng sont représentées par un dièse (#) et celles différentes de la condition 10 ng par une croix (x).

Comme précédemment, il serait intéressant de tester de nouvelles conditions pour mieux visualiser le comportement de notre enhancer en fonction de la quantité de

signal induit. Avec la construction inverse, la condition à 5 ng est légèrement plus faible que la normale (91%). Nous pourrions affiner entre 2,5 et 10 ng pour voir si comme en sens le rapport d'intensité remonte à 100%. Pour la construction sens comme pour l'inverse, nous nous attendrions à ce que des quantités de plasmides supérieures à 20 ng entraînent encore de plus fortes diminutions.

Contrairement à l'étude avec FGF, l'enhancer *Cdx2*NSE possède ici une activité bi-directionnelle puisque les deux orientations répondent de manière similaire à une surexpression de Smad5. Les signaux BMP forment un gradient médio-latéral *in vivo* avec de fortes concentrations aux extrémités et de faibles concentrations au niveau de la ligne primitive et l'induction des cellules de la crête neurale nécessite des concentrations intermédiaires de signaux BMP. Il est donc possible que les signaux BMP soit des inhibiteurs naturels de notre enhancer pour empêcher une expression ectopique de *Cdx2* dans l'ectoderme non neural et que seule la concentration de signaux BMP présente dans le neuroectoderme n'est pas d'effet sur notre enhancer pour ne pas empêcher son activation.

5.4 Effets de la voie Wnt canonique

Nos essais avec la protéine de fusion Lef δ N β CTA nous ont donné nos plus beaux résultats puisque notre enhancer *Cdx2*NSE réagit de manière identique dans les deux orientations. Nous obtenons dans les deux cas une diminution de la luminescence qui est inversement proportionnelle avec la quantité de plasmide utilisé (Figure 5.4). Avec la construction sens, la condition 2,5 ng nous donne une augmentation de l'activité de l'enhancer *Cdx2*NSE de 23% qui va graduellement chuter pour atteindre une réduction de 75% avec la condition 20ng. Semblablement avec la construction inverse, la condition 2,5 ng accroît son

activité de 39% puis va diminuer et induire une régulation négative de 56% pour la condition 20 ng.

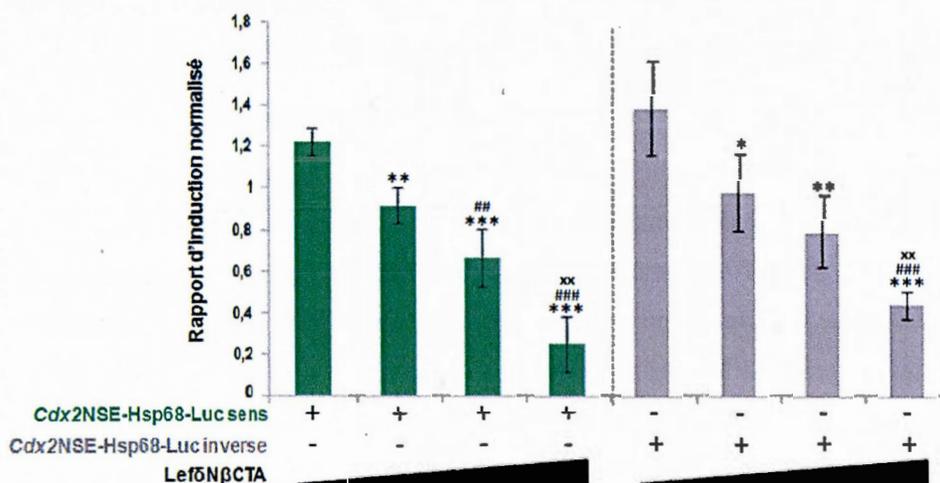


Figure 5.4. Effets de la voie Wnt canonique sur l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE*. Essais de co-transfections dans la lignée cellulaire Neuro2A utilisant le gène rapporteur de la luciférase. Les résultats représentent le rapport d'induction normalisé par le rapport obtenu avec le vecteur vide. Effets de l'activation constitutive de la voie Wnt canonique par surexpression de la protéine de fusion LefδNβCTA sur l'activité de l'enhancer *Cdx2NSE* cloné en sens (vert) et en inverse (gris). Les valeurs significativement différentes de la condition 2,5 ng sont représentées par un astérisque (*), celles différentes de la condition 5 ng sont représentées par un dièse (#) et celles différentes de la condition 10 ng par une croix (x).

La seule condition supplémentaire qui serait intéressante ici de tester serait de diminuer encore la quantité de plasmide codant pour la protéine de fusion à co-transfecter. Une induction plus forte de notre enhancer serait une très bonne chose à obtenir. Tout comme avec l'étude de l'effet de la voie BMP, notre enhancer *Cdx2NSE* est ici bi-directionnel. La perte d'activité se fait véritablement de manière graduelle puisque quasiment toutes les conditions possèdent des valeurs significativement différentes entre elles. Nous observons ici un effet activateur pour de faibles intensités de signal Wnt puis un changement progressif vers un

rôle d'inhibiteur fort. Cette inhibition ne peut être qu'indirecte car la protéine de fusion Lef δ N β CTA contient le domaine de transactivation de la β -caténine, elle ne peut donc jouer qu'un rôle d'activateur.

Cela pourrait se traduire *in vivo* par le gradient antéro-postérieur de signaux Wnt, allant de l'extrémité caudale vers le tronc de l'embryon. Durant la neurulation, la partie caudale ne cesse de s'allonger, ce qui s'explique par des phénomènes de gastrulation à son extrémité. L'épiblaste latéral caudal présent à l'extrémité va se différencier en neuroectoderme et en endoderme au fur et à mesure de l'élongation de l'embryon. Il se peut donc que les fortes intensités de signaux Wnt à l'extrémité caudale inhibent notre enhancer pour empêcher une différenciation trop rapide de l'épiblaste en neuroectoderme. Cette hypothèse va en contradiction avec nos observations utilisant le modèle murin *Cdx2*NSE-Cre puisque de la fluorescence YFP est observée dans l'extrémité postérieure du neuroectoderme caudal (Coutaud et Pilon 2013 ; Figure 1C' et Figure 2A', 2E'). Il se peut que l'intensité du signal mimé par la protéine de fusion Lef δ N β CTA soit excessive par rapport à une induction constitutive de la voie Wnt canonique endogène. L'effet inhibiteur observé pourrait s'expliquer par la surexpression d'un répresseur de *Cdx2* qui agirait en régulant négativement l'enhancer NSE. Un candidat potentiel serait l'inhibiteur neural NRSF ("neuron-restrictive silencer factor") dont un site potentiel de fixation est présent. Ce facteur de transcription est connu pour réprimer l'expression des gènes neuraux dans les cellules non neurales (Chong et al., 1995 ; Schoenherr et Anderson, 1995).

CHAPITRE VI

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE *PAX3* PAR LES PROTÉINES CDX VIA SON ENHANCER INTRONIQUE NCE3

6.1 Mise en place de l'expérience

Afin de déterminer l'effet des protéines Cdx sur l'enhancer intronique NCE3 de *Pax3*, nous avons utilisé globalement la même stratégie que décrite au chapitre précédent. L'enhancer NCE3 a été cloné en amont du promoteur minimal de *Pax3* dans un vecteur d'expression du gène de la luciférase. Nous avons utilisé la lignée cellulaire Neuro2A pour réaliser les co-transfections. L'analyse bio-informatique de la séquence de NCE3 nous a permis d'identifier plusieurs sites potentiels de fixation extrêmement intéressants. Nous retrouvons 5 sites potentiels de fixation des protéines Cdx mais également 4 sites potentiels de fixation Lef/Tcf. Il a déjà été suggéré que ces sites Lef/Tcf sont actifs (non prouvé) chez le poisson-zèbre (Dagenhardt et al., 2010) mais il a été montré que chez la souris, la régulation de *Pax3* par les signaux Wnt était indirecte (Sanchez-Ferras et al., 2012). Nous avons utilisé des plasmides de surexpression des protéines Cdx1, Cdx2 et Cdx4 co-transfectés avec notre vecteur NCE3-Pax3p-Luc. Tout comme précédemment, la protéine de fusion Lef δ N β CTA a servi de contrôle positif en co-transfection avec le plasmide pGL-OT qui contient plusieurs sites de fixation Lef1 en amont du gène rapporteur de la luciférase.

6.2 Effets des protéines Cdx

Nos résultats nous indiquent une augmentation de la luminescence pour Cdx1 et Cdx2. Les valeurs obtenues avec Cdx4 sont très proches de la normale, Cdx4 ne semble donc pas avoir d'effets sur l'activité de l'enhancer NCE3 (Figure 6.1). Nous visualisons pour Cdx1 et Cdx2 une augmentation de l'activité de NCE3 qui semble proportionnelle avec la quantité de plasmide de surexpression co-transfectée. Même si l'effet est visible avec ces deux protéines, les écarts types obtenus sont très grands entraînant ainsi des analyses statistiques qui ne rejettent pas l'hypothèse nulle. Nous dirons donc que les protéines Cdx1 et Cdx2 ont l'air d'entraîner une tendance vers une régulation positive de l'enhancer NCE3 mais qu'aucune conclusion ne peut être tirée simplement avec ces données.

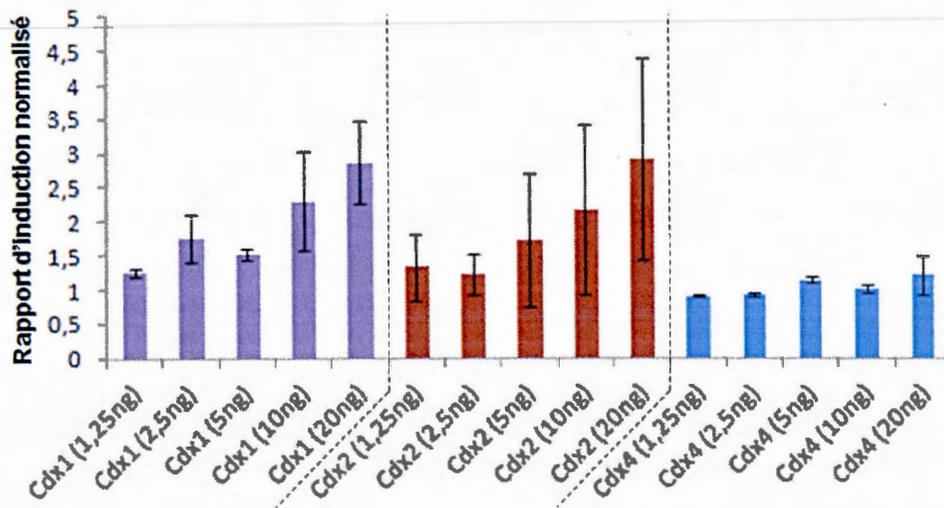


Figure 6.1. Effets des protéines Cdx sur l'activité de l'enhancer intronique NCE3 de Pax3. Essais de co-transfections dans la lignée cellulaire Neuro2A utilisant le gène rapporteur de la luciférase. Les résultats représentent le rapport d'induction normalisé par le rapport obtenu avec le vecteur vide. Effets de la surexpression des protéines Cdx1, Cdx2 et Cdx4 sur l'activité de l'enhancer NCE3.

L'échec dans l'analyse statistique peut provenir d'un nombre trop faible de mesures. Dans le chapitre précédent, les valeurs obtenues correspondaient à 4 expériences indépendantes alors qu'ici elles ne correspondent qu'à 2 ou 3 expériences. Ce manque de données s'explique par les problèmes de manipulations rencontrés, notamment par des efficacités de transfection hétérogènes au sein d'une même plaque 24 puits ou bien des efficacités faibles voire nulles. D'autres constructions constituées de différentes troncatures de l'enhancer NCE3 ont été créées mais, sur différents essais luciférase réalisés, seules une ou deux valeurs ont été récupérées par conditions. Ces résultats obtenus n'étant pas cohérents, ils ont été volontairement sorti en attendant d'être plus approfondis.

CHAPITRE VII

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

7.1 Caractérisation d'un système d'expression conditionnel spécifique au tube neural

Comme mentionné dans la discussion de notre article, notre nouvelle lignée murine *Cdx2*NSE-Cre peut devenir un précieux outil génétique dans l'étude de la neurulation et de la neurogenèse caudale. Elle est en effet capable de cibler l'intégralité du neuroectoderme postérieur (à la fois le tube neural et les cellules de la crête neurale) avec comme limite antérieure la partie caudale du rhombocéphalon. La lignée est présentement en cours de transition d'un fond génétique C57/BL6 vers un fond génétique FVB (naissance 3^e génération août 2013). Nous avons en effet observé une augmentation du nombre d'embryons ayant une fluorescence non spécifique (étendue à tout l'embryon) durant nos expériences lorsque le fond génétique de la portée se rapprochait du fond génétique C57/BL6.

Les résultats de l'article ont été générés par des croisements entre des mâles *Cdx2*NSE-Cre (C57/BL6) et des femelles R26R-YFP (FVB), ce qui nous apporte un fond génétique de 50% C57/BL6 et 50% FVB pour la portée. Nous avons également généré des croisements entre des mâles *Cdx2*NSE-Cre (C57/BL6) et des femelles R26R-YFP ayant un fond génétique mixte, ce qui présume que les embryons pouvaient être à moins de 50% avec un fond génétique FVB. La comparaison du patron de fluorescence des embryons résultant de 7 portées de ces deux croisements (Tableau 7.1) nous montrent que le fond génétique à un effet sur

la proportion d'embryons avec une fluorescence ectopique (17,2% contre 55,6% ; $p = 0,009$).

Croisement C57/BL6 x Mix	Nb E total	Nb E fluo	Nb E fluo neurale	Nb E fluo ectopique	Croisement C57/BL6 x Mix	Nb E total	Nb E fluo	Nb E fluo neurale	Nb E fluo ectopique
Portée 1	10	4	2	2	Portée 1	8	5	2	3
Portée 2	8	3	3	0	Portée 2	7	5	3	2
Portée 3	8	4	4	0	Portée 3	8	6	1	5
Portée 4	9	4	2	2	Portée 4	9	6	1	5
Portée 5	10	3	2	1	Portée 5	8	6	2	4
Portée 6	11	6	6	0	Portée 6	11	8	6	2
Portée 7	12	5	5	0	Portée 7	12	9	5	4
TOTAL	68	29	24	5	TOTAL	63	45	20	25

Fond génétique FVB 50%	E fluo / E total = 42,6% E fluo neurale / E total = 35,3% E fluo ectopique / E fluo = 17,2%	Fond génétique FVB <50%	E fluo / E total = 71,4% E fluo neurale / E total = 31,7% E fluo ectopique / E fluo = 55,6%
---------------------------	---	----------------------------	---

Tableau 7.1. Proportions d'embryons avec une fluorescence non spécifique suivant le fond génétique. Comparatif de 7 portées issues de croisements entre des mâles *Cdx2NSE-Cre* (C57/BL6) et des femelles R26R-YFP (fond génétique FVB ou mixte). Les deux premières colonnes correspondent au nombre d'embryons pour chaque portée (Nb E total) et au nombre d'embryons présentant de la fluorescence (Nb E fluo). Dans cette dernière, nous avons séparé les embryons présentant une fluorescence spécifique (Nb E fluo neurale) de ceux ayant une fluorescence non spécifique (Nb E fluo ectopique).

Il n'y a pas de différence entre les deux croisements pour la proportion d'embryons présentant une fluorescence spécifique (35,3% contre 31,7% ; $p = 0,578$), c'est la proportion totale d'embryons fluorescents qui diffère (42,6% contre 71,4% ; $p < 0,001$). Puisque les mâles *Cdx2NSE-Cre* utilisés sont hétérozygotes, la proportion théorique d'embryons fluorescence devrait être de 50%. Les portées d'embryons avec un fond génétique à 50% FVB affiche une hérédité mendélienne ($p = 0,053$) alors que celles avec un fond génétique inférieur à 50% FVB présentent une augmentation significative du nombre d'embryons fluorescent ($p < 0,001$). Nous supposons donc que les embryons avec une fluorescence ectopique supplémentaire ne possèdent pas le transgène *Cdx2NSE-*

Cre mais que le fond génétique "amoindri en FVB" apporté par le mâle arrive tout de même à induire l'expression de la YFP, et ceci de manière non spécifique.

Cette hypothèse a été confirmée par des croisements entre des mâles *Cdx2NSE-Cre* (C57/BL6) et des femelles d'autres lignées murines ayant une expression conditionnelle de la fluorescence GFP dans un fond génétique C57/BL6. Sur les 5 portées observées, tous les embryons fluorescents présentaient une fluorescence ectopique (données non présentées). Ceci indique donc que la présence du fond génétique FVB dans les embryons est nécessaire pour minimiser l'expression non spécifique de la fluorescence conditionnelle de nos lignées murines lorsque croisées avec la lignée *Cdx2NSE-Cre*. Il est donc nécessaire de transférer notre lignée transgénique *Cdx2NSE-Cre* vers un fond génétique FVB pour s'assurer que le fond génétique de la descendance soit au minimum à 50% FVB.

Même si notre modèle murin va nous permettre d'étudier la neurulation et la neurogenèse caudale *in vivo*, notre patron d'expression n'est pas exclusivement restreint aux cellules neurales puisqu'une sous population de cellules mésodermales sont marquées par la fluorescence YFP dans le quart le plus postérieur de l'embryon. L'étude *in vitro* de l'enhancer *Cdx2NSE* pourrait éventuellement mettre en avant les éléments spécifiques neuraux et mésodermaux de cette séquence, ce qui nous permettrait d'obtenir *in vivo* une expression conditionnelle strictement spécifique à la plaque neurale postérieure et à ces dérivés.

7.2 Caractérisation des voies de signalisation contrôlant l'enhancer intronique *Cdx2*NSE

L'étude *in vitro* de l'enhancer intronique *Cdx2*NSE nous a montré que les trois principales voies de signalisation impliquées dans le développement neural et l'induction des cellules de la crête neurale sont capables d'en réguler son activité. Le fait que les voies Wnt canonique, FGF et BMP aient dans notre modèle une capacité inhibitrice supérieure à leur capacité activatrice est un peu surprenant. Nous nous serions attendus surtout avec les voies Wnt canonique et FGF à des inductions plus fortes. Il se peut qu'il existe une synergie entre ces différentes voies et il faudrait par exemple stimuler les voies Wnt canonique et FGF en combinaison pour observer un effet beaucoup plus fort. Des troncatures de l'enhancer *Cdx2*NSE et/ou des mutations de certains sites potentiels de fixation nous permettrait également de mieux cerner le rôle de chacune des voies dans la régulation de son activité.

De plus, nous utilisons un modèle de cellules progénitrices des crêtes neurales, nos cellules sont donc déjà différenciées vers un phénotype neural. Il se peut que l'enhancer *Cdx2*NSE soit nécessaire pour l'expression de *Cdx2* lors de l'induction de cette différenciation de cellule épiblastique vers cellule neurale, mais que la maintenance de l'expression de *Cdx2* dans les cellules neurales soit régulée principalement par une ou plusieurs autres régions régulatrices. Même si de telles régions existent, ceci ne peut pas expliquer les effets principalement inhibiteurs observés dans nos résultats. En effet, les marquages à la β -galactosidase sur des embryons E.9.5 par Wang et Shashikant, 2007 nous montrent que l'enhancer *Cdx2*NSE est toujours actif dans le tube neural (Figure 6B et C).

Les effets inhibiteurs observés sont peut être directement dus à notre système puisque chacune de ces voies de signalisation va avoir un gradient spatio-temporel *in vivo* que nous mimons *in vitro* avec un effet dose réponse. Les cellules répondent *in vivo* à un pic d'induction propre à chaque voie alors que notre

système *in vitro* va plus ressembler à un système on/off où les fortes inductions ne correspondent peut être pas aux conditions physiologiques. De plus, dans les conditions physiologiques des cellules neurales, ces trois voies devraient être constamment induites, c'est au niveau du dosage de l'intensité de chacun de ces signaux mis en combinaison qui va créer l'environnement spatio-temporel adéquat au bon phénotype de chaque cellule.

Il serait intéressant de tester la régulation de l'enhancer *Cdx2*NSE par ces différentes voies de signalisation dans des cellules moins différenciées. Nous possédons au laboratoire la lignée cellulaire P19 qui est dérivée de cellules de carcinome embryonnaire murin. Ces cellules multipotentes ont la capacité de se différencier en lignées cellulaires spécifiques des trois feuilletts embryonnaires, notamment en lignée neuronale par traitement à l'acide rétinoïque ou avec un milieu riche en ligand *Wnt3a*. Il se peut donc que les effets de chaque voie de signalisation soient différents lorsque le modèle cellulaire possède un phénotype tendant plus vers celui de cellules de la plaque neurale postérieure.

La construction avec l'enhancer en sens inverse serait sûrement plus judicieuse à utiliser pour la suite de l'étude car les trois voies ici testées répondent à cette orientation. Il ne faut pas oublier que notre modèle *in vitro* correspond à un enhancer intronique positionné de manière proximale. Son environnement génétique peut donc influencer sur son activité et sur sa conformation tridimensionnelle. Cet enhancer semble plus efficace dans notre étude en sens inverse mais peut éventuellement être unidirectionnel *in vivo*. La conformation de la chromatine peut également réguler les facteurs de transcription recrutés de manière spatio-temporelle.

7.3 Caractérisation moléculaire de la régulation de l'enhancer intronique NCE3 de *Pax3* par les protéines Cdx

Cette étude correspond à la partie la moins complétée du projet mais nos résultats préliminaires sont encourageants. Nous possédons maintenant toutes les constructions nécessaires pour répéter les essais luciférase avec l'enhancer intronique NCE3 cloné en sens mais également en inverse ainsi que différentes troncutures de ce dernier. L'effet des protéines Cdx sur l'activité de l'enhancer NCE3 peut aussi être testé en se servant du dominant négatif EnRCdx1 déjà décrit (Sanchez-Ferras et al., 2012). Nous nous attendons à ce que Cdx1 et Cdx2 soient capables de réguler positivement l'activité de l'enhancer NCE3, Cdx4 étant connu pour avoir un rôle secondaire et n'ayant montré aucune tendance dans nos résultats préliminaires.

En perspective, des mutations des sites potentiels des protéines Cdx ainsi que des essais de retard sur gel et d'immunoprécipitation de chromatine pourront être utilisées pour compléter la caractérisation de cette potentielle régulation. Comme les enhancers conservés neuraux NCE1, NCE2 et NCE3 sont fonctionnellement redondants et que NCE1 et NCE2 sont régulés par la voie Wnt-Cdx, une régulation de l'activité de NCE3 par les protéines Cdx indiquerait que ces dernières seraient responsables de la régulation de l'expression neurale de *Pax3* dans son ensemble.

RÉFÉRENCES

Alvarez-Medina R, Cayuso J, Okubo T, Takada S et Martí E. 2008. Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development*, 135(2):237-47.

Beck F, Erler T, Russell A et James R. 1995. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn*, 204(3):219-27.

Bel-Vialar S, Itasaki N et Krumlauf R. 2002. Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development*, 129(22):5103-15.

Béland M, Pilon N, Houle M, Oh K, Sylvestre JR, Prinos P et Lohnes D. 2004. Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol Cell Biol*, 24(11):5028-38.

Bertrand V, Hudson C, Caillol D, Popovici C et Lemaire P. 2003. Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell*, 115(5):615-27.

Betancur P, Bronner-Fraser M et Sauka-Spengler T. 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 10;26:581-603.

Bier E. 2011. Evolution of development: diversified dorsoventral patterning. *Curr Biol*, 21(15):R591-4.

Bronner-Fraser M. 1986. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev Biol*, 115(1):44-15.

Brooke NM, Garcia-Fernández J et Holland PW. 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature*, 392(6679):920-2.

Burstyn-Cohen T, Stanleigh J, Sela-Donenfeld D et Kalcheim C. 2004. Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition. *Development*, 131(21):5327-39.

Charité J, de Graaff W, Consten D, Reijnen MJ, Korving J et Deschamps J. 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of

cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development*, 125(22):4349-58.

Chawengsaksophak K, de Graaff W, Rossant J, Deschamps J et Beck F. 2004. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 18;101(20):7641-5.

Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD et Mandel G. 1995. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell*, 24;80(6):949-57.

Colombres M, Rodriguez JP, Reig GF, Scheu J, Calderón R, Alvarez A, Brandan E et Inestrosa NC. 2008. Heparin activates Wnt signaling for neuronal morphogenesis. *J Cell Physiol*, 216(3):805-15.

Constance Lane M, Davidson L et Sheets MD. 2004. BMP antagonism by Spemann's organizer regulates rostral-caudal fate of mesoderm. *Dev Biol*, 15;275(2):356-74.

Copp AJ, Greene ND et Murdoch JN. 2003. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet*, 4(10):784-93.

Copp AJ, Stanier P et Greene ND. 2013. Neural tube defects : recent advances, unsolved questions, and controversies. *Lancet Neurol*, 12(8):799-810.

Coutaud B et Pilon N. 2013. Characterization of a novel transgenic mouse line expressing Cre recombinase under the control of the Cdx2 neural specific enhancer. *Genesis*, 10.1002/dvg.22421

Degenhardt KR, Milewski RC, Padmanabhan A, Miller M, Singh MK, Lang D, Engleka KA, Wu M, Li J, Zhou D, Antonucci N, Li L et Epstein JA. 2010. Distinct enhancers at the Pax3 locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions. *Dev Biol*, 15;339(2):519-27.

Doniach T. 1995. Basic FGF as an inducer of anteroposterior neural pattern. *Cell*, 29;83(7):1067-70.

Donovan M, Olofsson B, Gustafson AL, Dencker L et Eriksson U. 1995. The cellular retinoic acid binding proteins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53:459-65.

Erickson CA et Weston A. 1983. An SEM analysis of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morphol*, 74:97-118.

Gamer LW et Wright CV. 1993. Murine Cdx-4 bears striking similarities to the Drosophila caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev*, 43(1):71-81.

- Gao N, White P et Kaestner KH.** 2009. Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell*, 16(4):588-99.
- Gaunt SJ, Drage D et Trubshaw RC.** 2008. Increased Cdx protein dose effects upon axial patterning in transgenic lines of mice. *Development*, 135(15):2511-20.
- Gong Y, Mo C et Fraser SE.** 2004. Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature*, 5;430(7000):689-93.
- Grainger S, Lam J, Savory JG, Mears AJ, Rijli FM et Lohnes D.** 2012. Cdx regulates Dll1 in multiple lineages. *Dev Biol*, 1;361(1):1-11.
- Gressens P, Collin P, Lebarbier P, Husson I, Penneçot G, Blot P, Bonnier C et Evrard P.** 1998. Prenatal diagnosis and outcome of patients with spina bifida. *Arch Pediatr*, 5(9):1004-8.
- Heanue TA et Pachnis V.** 2007. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci.*, 8(6):466-79.
- Hoppler S, Brown JD et Moon RT.** 1996. Expression of a dominant-negative Wnt blocks induction of MyoD in *Xenopus* embryos. *Genes Dev*, 1;10(21):2805-17.
- Houle M, Prinos P, Iulianella A, Bouchard N et Lohnes D.** 2000. Retinoic acid regulation of Cdx1: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol Cell Biol*, 20(17):6579-86.
- Houle M, Sylvestre JR et Lohnes D.** 2003. Retinoic acid regulates a subset of Cdx1 function in vivo. *Development*, 130(26):6555-67.
- Iimura T, Denans N et Pourquié O.** 2009. Establishment of Hox vertebral identities in the embryonic spine precursors. *Curr Top Dev Biol*, 88:201-34.
- Isaacs HV, Pownall ME et Slack JM.** 1998. Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *EMBO J*, 15;17(12):3413-27.
- Jeffery WR, Strickler AG et Yamamoto Y.** 2004. Migratory neural crest-like cells form body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature*, 7;431(7009):696-9.
- Keenan ID, Sharrard RM et Isaacs HV.** 2006. FGF signal transduction and the regulation of Cdx gene expression. *Dev Biol*, 15;299(2):478-88.
- Kinkel MD, Eames SC, Alonzo MR et Prince VE.** 2008. Cdx4 is required in the endoderm to localize the pancreas and limit beta-cell number. *Development*, 135(5):919-29.

- Krejci P, Masri B, Salazar L, Farrington-Rock C, Prats H, Thompson LM et Wilcox WR.** 2007. Bisindolylmaleimide I suppresses fibroblast growth factor-mediated activation of Erk MAP kinase in chondrocytes by preventing Shp2 association with the Frs2 and Gab1 adaptor proteins. *J Biol Chem.*, 2;282(5):2929-36.
- Kudoh T, Wilson SW et Dawid IB.** 2002. Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development*, 129(18):4335-46.
- Lamb TM et Harland RM.** 1995. Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development*, 121(11):3627-36.
- Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, Jang IH, Maouche-Chretien L, McKinney-Freeman S, Davidson AJ, Hammerschmidt M, Rentzsch F, Green JB, Zon LI et Daley GQ.** 2008. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell*, 10;2(1):72-82.
- Lengerke C, Wingert R, Beeretz M, Grauer M, Schmidt AG, Konantz M, Daley GQ et Davidson AJ.** 2011. Interactions between Cdx genes and retinoic acid modulate early cardiogenesis. *Dev Biol*, 1;354(1):134-42.
- Lickert H, Domon C, Huls G, Wehrle C, Duluc I, Clevers H, Meyer BI, Freund JN et Kemler R.** 2000. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development*, 127(17):3805-13.
- Logan CY et Nusse R.** 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:781-810.
- Loring JF et Erickson CA.** 1987. Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. *Dev Biol*, 121(1):220-36.
- Liu Q, Melnikova IN, Hu M et Gardner PD.** 1999. Cell type-specific activation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes by Sox10. *J Neurosci.*, 15;19(22):9747-55.
- Liu S, Dontu G et Wicha MS.** 2005. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.*, 7(3):86-95.
- Maden M.** 2002. Retinoid signaling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci.*, 3(11):843-53.
- Mahmoudi A, Rami K, Khattala K, Elmadi A, Afiti MA et Youssef B.** 2013. Shah-Waardenburg syndrome. *Pan Afr Med J*, 14:60.
- Mansouri A.** 1998. The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer. *Crit Rev Oncog.*, 9(2):141-9.

- Martínez-Morales PL, Díez del Corral R, Olivera-Martínez I, Quiroga AC, Das RM, Barbas JA, Storey KG et Morales AV.** 2011. FGF and retinoic acid activity gradients control the timing of neural crest cell emigration in the trunk. *J Cell Biol*, 8;194(3):489-503.
- Meulemans D et Bronner-Fraser M.** 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev Cell*, 7(3):291-9.
- Meyer BI et Gruss P.** 1993. Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development*, 117(1):191-203.
- Milewski RC, Chi NC, Li J, Brown C, Lu MM et Epstein JA.** 2004. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development*, 131(4):829-37.
- Mita K et Fujiwara S.** 2007. Nodal regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev Genes Evol*, 217(8):593-601.
- Miyazono K. 1999. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*, 25(1):91-3.
- Mizutani CM et Bier E.** 2008. EvoD/Vo: the origins of BMP signalling in the neuroectoderm. *Nat Rev Genet*, 9(9):663-77.
- Monsoro-Burq AH, Wang E et Harland R.** 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Dev Cell*, 8(2):167-78.
- Moon RT, Bowerman B, Boutros M et Perrimon N.** 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science*, 31;296(5573):1644-6.
- Natoli TA, Ellsworth MK, Wu C, Gross KW et Pruitt SC.** 1997. Positive and negative DNA sequence elements are required to establish the pattern of Pax3 expression. *Development*, 124(3):617-26.
- Nakaya MA, Biris K, Tsukiyama T, Jaime S, Rawls JA et Yamaguchi TP.** 2005. Wnt3a links left-right determination with segmentation and anteroposterior axis elongation. *Development*, 132(24):5425-36.
- Nordström U, Maier E, Jessell TM et Edlund T.** 2006. An early role for WNT signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PLoS Biol*, 4(8):e252.
- Orban PC, Chui D et Marth JD.** 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad U S A*, 89(15):6861-5.
- Park WJ, Meyers GA, Li X, Theda C, Day D, Orlow SJ, Jones MC et Jabs EW.** 1995. Novel FGFR2 mutations in Crouzon and Jackson-Weiss syndromes

show allelic heterogeneity and phenotypic variability. *Hum Mol Genet.*, 4(7):1229-33.

Paschaki M, Lin SC, Wong RL, Finnell RH, Dollé P et Niederreither K. 2012. Retinoic acid-dependent signaling pathways and lineage events in the developing mouse spinal cord. *PLoS One*, 7(3):e32447.

Pasero M, Giovarelli M, Bucci G, Gherzi R et Briata P. 2012. Bone morphogenetic protein /SMAD signaling orients cell fate decision by impairing KSRP-dependent microRNA maturation. *Cell Rep.*, 29;2(5):1159-68.

Pilon N, Oh K, Sylvestre JR, Bouchard N, Savory J et Lohnes D. 2006. Cdx4 is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Dev Biol*, 1;289(1):55-63.

Pilon N, Oh K, Sylvestre JR, Savory JG et Lohnes D. 2007. Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo. *Development*, 134(12):2315-23.

Prinos P, Joseph S, Oh K, Meyer BI, Gruss P et Lohnes D. 2001. Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev Biol*, 15;239(2):257-69.

Pruitt SC, Bussman A, Maslov AY, Natoli TA et Heinaman R. 2004. Hox/Pbx and Brn binding sites mediate Pax3 expression in vitro and in vivo. *Gene Expr Patterns*, 4(6):671-85.

Rickman M, Fawcett JK et Keynes RJ. 1985. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. *J Embryol Exp Morphol*, 90:437-55.

Sanchez Ferras O, Coutaud B, Djavanbakht Samani T, Tremblay I, Souchkova O et Pilon N. 2012. Caudal-related homeobox (Cdx)-dependent integration of canonical Wingless/int1-related (Wnt) signals on a well-conserved neural crest enhancer of the proximal Paired-box 3 (Pax3) promoter. *J Biol Chem*, 287(20):16623-35.

Sauka-Spengler T et Bronner-Fraser M. 2008. Evolution of the neural crest viewed from a gene regulatory perspective. *Genesis*, 46(11):673-82.

Sauka-Spengler T et Bronner M. 2010. Snapshot: neural crest. *Cell*, 143(3):486-486.

Savagner P. 2010. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7:vii89-92.

Savory JG, Pilon N, Grainger S, Sylvestre JR, Béland M, Houle M, Oh K et Lohnes D. 2009. Cdx1 and Cdx2 are functionally equivalent in vertebral patterning. *Dev Biol*, 1;330(1):114-22.

Savory JG, Bouchard N, Pierre V, Rijli FM, De Repentigny Y, Kothary R et Lohnes D. 2009-b. Cdx2 regulation of posterior development through non-Hox targets. *Development*, 136(24):4099-110.

Savory JG, Mansfield M, St Louis C et Lohnes D. 2011. Cdx4 is a Cdx2 target gene. *Mech Dev*, 128(1-2):41-8.

Savory JG, Mansfield M, Rijli FM et Lohnes D. 2011-b. Cdx mediates neural tube closure through transcriptional regulation of the planar cell polarity gene Ptk7. *Development*, 138(7):1361-70.

Schoenherr CJ et Anderson DJ. 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, 3;267(5202):1360-3.

Serbedzija P, Fraser SE et Bronner-Fraser M. 1990. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labeling. *Development*, 108(4):605-12.

Serpente P, Tümpel S, Ghyselinck NB, Niederreither K, Wiedemann LM, Dollé P, Chambon P, Krumlauf R et Gould AP. 2005. Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development*, 132(3):503-13.

Sherwood RI, Maehr R, Mazzoni EO et Melton DA. 2011. Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. *Mech Dev*, 128(7-10):387-400.

Shi F, Chen YF, Wang XL et Edge AS. 2010. Beta-catenin up-regulates Atoh1 expression in neural progenitor cells by interaction with an Atoh1 3' enhancer. *J Biol Chem*, 285(1):392-400.

Shimizu T, Bae YK et Hibi M. 2006. Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue. *Development*, 133(23):4709-19.

Sirbu IO et Duester G. 2006. Retinoic-acid signalling in node ectoderm and posterior neural plate directs left-right patterning of somitic mesoderm. *Nat Cell Biol*, 8(3):271-7.

Skromne I, Thorsen D, Hale M, Prince VE et Ho RK. 2007. Repression of the hindbrain developmental program by Cdx factors is required for the specification of the vertebrate spinal cord. *Development*, 134(11):2147-58.

Steventon B, Araya C, Linker C, Kuriyama S et Mayor R. 2009. Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development*, 136(5):771-9.

Stringer EJ, Duluc I, Saandi T, Davidson I, Bialecka M, Sato T, Barker N, Clevers H, Pritchard CA, Winton DJ, Wright NA, Freund JN, Deschamps J

- et Beck F. 2012. Cdx2 determines the fate of postnatal intestinal endoderm. *Development*, 139(3):465-74.
- Stovroff M, Dykes F et Teague WG. 1995. The complete spectrum of neurocristopathy in an infant with congenital hypoventilation, Hirschsprung's disease, and neuroblastoma. *J Pediatr Surg.*, 30(8):1218-21.
- Stuhlmiller TJ et García-Castro MI. 2012. FGF/MAPK signaling is required in the gastrula epiblast for avian neural crest induction. *Development*, 139(2):289-300.
- Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F et Rossant J. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development*, 132(9):2093-102.
- Sturgeon K, Kaneko T, Biemann M, Gauthier A, Chawengsaksophak K et Cordes SP. 2011. Cdx1 refines positional identity of the vertebrate hindbrain by directly repressing *Mafb* expression. *Development*, 138(1):65-74.
- Sylvie J, Ellen C et Kris V. 2011. The role of Wnt in cell signaling and cell adhesion during early vertebrate development. *Front Biosci*, 1;17:2352-66.
- Takemoto T, Uchikawa M, Kamachi Y et Kondoh H. 2006. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development*, 133(2):297-306.
- Tanaka M, Hadjantonakis AK, Vintersten K et Nagy A. 2010. Aggregation Chimeras: Combining ES cells, diploid and tetraploid embryos. *Methods Mol Biol*, 530:287-309.
- Taneyhill LA et Bronner-Fraser M. 2005. Dynamic alterations in gene expression after Wnt-mediated induction of avian neural crest. *Mol Biol Cell*, 16(11):5283-93.
- Teillet MA, Kalcheim C et Le Douarin NM. 1987. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev Biol*, 120(2):329-47.
- Tonegawa A, Funayama N, Ueno N et Takahashi Y. 1997. Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development*, 124(10):1975-84.
- Utomo AR, Nikitin AY et Lee WH. 1999. Temporal, spatial and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, 17(11):1091-6.
- Van den Akker E, Forlani S, Chawengsaksophak K, de Graaff W, Beck F, Meyer BI et Deschamps J. 2002. Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in

anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development*, 129(9):2181-93.

Van de Ven C, Bialecka M, Neijts R, Young T, Rowland JE, Stringer EJ, Van Rooijen C, Meijlink F, Nóvoa A, Freund JN, Mallo M, Beck F et Deschamps J. 2011. 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*, 138(16):3451-62.

Villanueva S, Glavic A, Ruiz P et Mayor R. 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev Biol*, 15;241(2):289-301.

Vleminckx K, Kemler R et Hecht A. 1999. The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech Dev*, 81(1-2):65-74.

Wang WC et Shashikant CS. 2007. Evidence for positive and negative regulation of the mouse Cdx2 gene. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 15;308(3):308-21.

Wang XD, Morgan SC et Loeken MR. 2011. Pax3 stimulates p53 ubiquitination and degradation independent of transcription. *PLoS One*, 6(12):e29379.

Wang Y, Yabuuchi A, McKinney-Freeman S, Ducharme DM, Ray MK, Chawengsaksophak K, Archer TK et Daley GQ. 2008. Cdx gene deficiency compromises embryonic hematopoiesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 3;105(22):7756-61.

Wingert RA, Selleck R, Yu J, Song HD, Chen Z, Song A, Zhou Y, Thisse B, Thisse C, McMahon AP et Davidson AJ. 2007. The cdx genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. *PLoS Genet*, 3(10):1922-38.

Yang ZN, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li TK et Bosron WF. 1994. Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 18:587-91.

Young T, Rowland JE, van de Ven C, Bialecka M, Novoa A, Carapuco M, van Nes J, de Graaff W, Duluc I, Freund JN, Beck F, Mallo M et Deschamps J. 2009. Cdx and Hox genes differentially regulate posterior axial growth in mammalian embryos. *Dev Cell*, 17(4):516-26.

Zhang F, Nagy Kovács E et Featherstone MS. 2000. Murine hoxd4 expression in the CNS requires multiple elements including a retinoic acid response element. *Mech Dev*, 96(1):79-89.