

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE *Pax-3*  
PAR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION *Cdx*

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
TARANEH DJAVANBAKHT SAMANI

MARS 2011

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 [la] 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.»

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche Pr. Nicolas Pilon pour m'avoir offert une place au sein de son équipe. J'exprime également mes remerciements au Dr. Mélanie Béland pour ses précieux enseignements qui m'ont permis d'acquérir un bon esprit de synthèse. Je remercie Denis Flipo pour sa disponibilité tout le long de ma maîtrise. Un grand merci à Ouliana Souchkovna, ainsi que Dr. Hiroaki Taniguchi pour leurs encouragements chaleureux et leurs conseils qui m'ont été précieux pendant cette maîtrise. Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire : Alain Boulende, Oraly Sanchez, Isabelle Tremblay et Baptiste Coutaud. Enfin, je remercie Diane Tshikudi, Chirine Toufaily et Émilie Laroque pour leurs encouragements chaleureux.

Je remercie les professeurs Benoît Barbeau, Éric Rassart, François Dragon et Tatiana Scorza pour leurs soutiens moraux et le prêt du matériel.

Je tiens à remercier les membres de ma famille. Je les remercie particulièrement pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I.....	3
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1.1 Développement précoce du système nerveux.....	3
1.1.1 Neurulation.....	3
1.1.2 Tube neural.....	3
1.1.3 Crête neurale.....	6
1.1.4 Contrôle moléculaire de l'induction des cellules de la crête neurale.....	8
1.2 Le gène <i>Pax3</i> .....	10
1.2.1 Différents rôles de <i>Pax3</i> dans le développement de la crête neurale.....	11
1.2.2 Régulation de l'expression de <i>Pax3</i> .....	12
1.3 Induction de <i>Pax3</i> par la voie Wnt: rôle des protéines <i>Cdx</i> .....	13
1.3.1 Patron d'expression des <i>Cdx</i> dans le neuroectoderme et les cellules de la crête neurale.....	14
1.3.2 Contrôle de l'expression des gènes <i>Cdx</i> par les signaux Wnt/ $\beta$ -caténine .	16
1.3.3 Fonctions neurales des protéines <i>Cdx</i> .....	18
1.4 Résultats préliminaires.....	18
1.6 Hypothèses et objectifs .....	21
1.6.1 Hypothèses.....	21
1.6.2 Objectifs .....	21
CHAPITRE II.....	22
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
2.1 Culture cellulaire.....	22

2.2. Construction de Pax3p1.6 kb -Luciférase .....	22
2.3 Construction de EnRCdx1.....	22
2.4 Régulation endogène.....	23
2.4.1 Transfection de constructions plasmidiques.....	23
2.4.2 Microscopie de fluorescence.....	24
2.4.3 Triage des cellules.....	24
2.4.4 Extraction de l'ARNm.....	24
2.4.5 RT-PCR.....	25
2.4.6 Extraction des protéines cellulaires .....	27
2.4.7 Analyse de l'expression des protéines Cdx et Pax3 .....	28
2.4.7.1 Électrophorèse des protéines sur le gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) .....	28
2.4.7.2 Transfert de protéines .....	28
2.4.7.3 Immunobuvardage.....	29
2.5 Fonctionnalité des sites potentiels.....	30
2.5.1 Mutagenèse et co-transfections.....	30
2.5.2 Essai Luciférase.....	33
CHAPITRE III.....	34
RÉSULTATS.....	34
3.1. Les cellules Neuro2a expriment la protéine GFP 48 h après les transfections	34
3.2 Immunobuvardage des protéines Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnRCdx1, Flag-EnR extraites des cellules Cos7.....	34
3.3 Les facteurs de transcription Cdx régulent l'expression de <i>Pax3</i> endogène.....	34
3.4 L'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase augmente en présence des protéines Cdx et diminue en présence de Flag-EnRCdx1 en fonction de la concentration.....	38
3.5 La fragmentation du promoteur proximal de <i>Pax3</i> montre une réponse à Cdx2 au niveau de NCE1 et NCE2.....	38
3.6 Les mutations des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx ne	

diminuent pas une réponse du promoteur proximal de <i>Pax3</i> à <i>Cdx2</i> .....	41
3.7 Les co-facteurs potentiels des <i>Cdx</i> sont régulés dans les cellules <i>Neuro2a</i> et <i>P19</i> .....	42
3.8 Une synergie existe entre les facteurs de transcription <i>Cdx</i> et <i>Brn1</i> sur la région NCE2 de <i>Pax3</i> .....	45
3.9 La mutation du site de liaison pour <i>Brn1</i> ne diminue pas l'activité de la région NCE2 de <i>Pax3</i> .....	46
CHAPITRE IV.....	49
DISCUSSION.....	49
4.1 Régulation endogène de <i>Pax3</i> par les protéines <i>Cdx</i> et le dominant négatif <i>EnRCdx1</i> .....	50
4.1.1 L'induction de l'expression endogène de <i>Pax3</i> par les <i>Cdx</i> .....	50
4.1.2 La diminution de l'expression endogène de <i>Pax3</i> par <i>Flag-EnRCdx1</i> ....	50
4.2 L'augmentation et la diminution de l'expression de <i>Pax3p1.6kb-Luciférase</i> en présence des protéines <i>Cdx</i> ou de <i>Flag-EnRCdx1</i> en fonction de la concentration.....	51
4.3 Fragmentation du promoteur proximal de <i>Pax3</i> au niveau des sites de liaison pour les protéines <i>Cdx</i> .....	51
4.4 Mutation des sites de liaison pour les <i>Cdx</i> sur le promoteur proximal de <i>Pax3</i> .....	52
4.5 Régulation des co-facteurs potentiels des <i>Cdx</i> dans les cellules <i>Neuro2a</i> et <i>P19</i> .....	52
4.6 Synergie entre les protéines <i>Cdx</i> et <i>Brn1</i> sur le promoteur proximal de <i>Pax3</i> .53	
4.7 Mutation du site de liaison pour <i>Brn1</i> sur le promoteur proximal de <i>Pax3</i> .....	53
CHAPITRE V.....	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVE.....	55
CHAPITRE VI .....	59
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	59
6.1 Effet spécifique du dominant négatif <i>EnRCdx1</i> .....	59

6.2. Analyse des protéines Pax3 et Gapdh extraites des cellules Cos7.....	59
6.2.1 Conditions optimales pour analyser la protéine Pax3.....	59
6.2.2 Résultats d'immunobuvardage des cellules Cos7.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	62

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Ectoderme neural et formation du tube neural.....	4
Figure 1.2: Migration des cellules de la crête neurale .....	7
Figure 1.3: Réseau de gènes impliqués pour le développement de la crête neurale....	10
Figure 1.4: Patron d'expression de Cdx 1, Cdx2, Pax3 et Sox9.....	15
Figure 1.5: Stabilisation de $\beta$ -caténine dans le noyau de la cellule par la voie Wnt...17	
Figure 1.6: Expression de Pax3 dans les embryons de type sauvage et sans Cdx1 au stade 6 somites (e8.25).....	19
Figure 1.7: L'analyse par RT-PCR de la co-expression de Pax3 avec les gènes Cdx dans les cellules Neuro2a.....	19
Figure 1.1: Essai d'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules Neuro2a démontrant que les protéines Flag-Cdx1 ou Flag-EnRCdx1 peuvent occuper la région NCE2 du promoteur Pax3 endogène.....	20
Figure 3.1: Marquage des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression des Cdx ou du dominant négatif Flag-EnRCdx1.....	35
Figure 3.2: Expression des protéines Flag-EnR, Flag-EnRCdx1, Cdx1, Cdx2 et Cdx4 dans les cellules Cos7 mesurée par Western blot.....	36
Figure 3.3: Régulation de l'expression de l'ARNm de Pax3 dans les cellules Neuro2a suite aux transfections avec chacun des plasmides d'expression des Cdx (Cdx1, 2 et 4) et de Flag-EnRCdx1.....	37
Figure 3.4: Régulation de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase suite à la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Flag-EnRCdx1 ou Flag-EnR.....	39
Figure 3.5: Régulation de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase suite à la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Flag-EnRCdx1 et des protéines Cdx (Cdx1, 2 et 4).....	40
Figure 3.6: Activité des fragments du promoteur proximal de Pax3 en réponse à	

Cdx2.....	41
Figure 3.7: Séquence de NCE. Les NCE1 et NCE2 ainsi que les 3 sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sont identifiés.....	43
Figure 3.8: Effet de la mutation des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de <i>Pax3</i> .....	44
Figure 3.9: Régulation des co-facteurs potentiels des Cdx dans les cellules Neuro2a. ....	45
Figure 3.10: Synergie entre les facteurs de transcription Cdx2 et Brn1 sur la région NCE2 de <i>Pax3</i> .....	47
Figure 3.11: Synergie entre les facteurs de transcription Cdx et Brn1 malgré la mutation du site de liaison pour Brn1 sur la région NCE2 de <i>Pax3</i> .....	48
Figure 6.1: Études de spécificité du dominant négatif EnRCdx1.....	60
Figure 6.2: Expression des protéines Gapdh et Pax3 dans les cellules Cos7 mesurée par Western blot.....	61

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Étude de concentration d'anticorps.....	61
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP	Antéropostérieur
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
Bm	<i>Brain-specific transcription factor</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
Cdx	<i>Caudal homeo box</i>
ChIP	Immunoprécipitation de chromatine
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
dNTP	Déoxyribonucleotide triphosphate
DpnI	<i>Methylation dependent restriction enzyme</i>
DTT	Dithiothréitol
DV	Dorsoventral
e	Jour embryonnaire
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECR	<i>Evolutionary conserved region</i>
EGR	<i>Early growth response factor</i>
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique
EGTA	Acide éthylèneglycoltétraacétique
EMEM	<i>Eagle's minimum essential medium</i>
EMX	<i>Empty spiracles transcription factors</i>
EnR	<i>Engrailed repressor domain</i>

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FoxD3	<i>Forkhead box transcriptional repressor</i>
GAPDH	<i>Glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase</i>
GATA	<i>Transcription factor binding GATA DNA sequence</i>
Gbx	<i>Gastrulation brain homeobox transcription factors</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
HNF-1 $\alpha$	<i>Hepatocyte nuclear factor alpha</i>
Hox	<i>Homeobox transcription factors</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
kb	<i>Kilo paire de bases nucléiques</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factors</i>
MEF	<i>Mouse embryo fibroblast</i>
MITF	<i>Microphthalmia-associated transcription factors</i>
Msx	<i>Muscle segment homeobox transcription factors</i>
MyoD	<i>Myogenic determination transcription factor</i>
NCE	<i>Neural crest enhancer</i>
Oct	<i>Octamer transcription factor</i>
Oligo	<i>Oligonucléotide</i>
OTX	<i>Orthodenticle homeobox transcription factors</i>
PAGE	<i>Électrophorèse sur gel de polyacrylamide</i>
Pax	<i>Paired box transcription factors</i>
pb	<i>Paire de bases nucléiques</i>
Pbx	<i>Pre-B cell homeobox transcription factors</i>
PCR	<i>Réaction de polymérase en chaîne, amplification d'un segment d'ADN</i>
PMSF	<i>Phenyl methane sulfonyl fluoride</i>

POU	<i>Pituitary octamer Unc-86 transcription factors</i>
PSA	Persulfate d'ammonium
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RA	<i>Retinoic acid</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptors</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RT-PCR	Transcription inverse associée à une PCR
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
SNC	Système nerveux central
TBST	<i>Tris-buffered saline tween 20</i>
Tcf	<i>T-cell factors</i>
Tead	<i>TEA domain transcription factors</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyléthylènediamine
TRIS	Tampon Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
Sox	<i>SRY-related HMG-box factors</i>
UV	<i>Ultra-violet</i>
Wnt	<i>Wingless and Int-related</i>

## LISTE DES SYMBOLES

°C	Température en degrés Celsius
cpm	Compte par million
g	Force centrifuge
h	Heure
m	Milli, $10^{-3}$
min	Minute
%	Pourcentage
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unités
V	Volt, unité de mesure de différence de potentiel
n	Nano, $10^{-9}$
μ	Micro, $10^{-6}$

## RÉSUMÉ

La formation du tube neural et l'induction de la crête neurale sont des processus importants qui se passent au cours de la neurulation. Le système nerveux central se forme à partir du tube neural, alors que le système nerveux périphérique, le squelette cranio-facial et les mélanocytes se forment à partir de la crête neurale. Cependant, plusieurs maladies génétiques liées au développement anormal du tube neural et de la crête neurale existent chez l'homme. Donc, notre équipe s'est intéressée à faire une recherche au niveau moléculaire dans ce domaine. Le développement du tube neural et des cellules de la crête neurale est influencé par la présence de plusieurs voies de signalisation y compris la voie Wnt. Nous avons focalisé notre étude sur la transcription du gène *Pax3* qui code pour un facteur de transcription qui s'exprime dans le tube neural et les cellules pré-migratoires de la crête neurale. L'induction de *Pax3*, des cellules de la crête neurale ainsi que l'expression des gènes *Cdx* (*Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4*) se font par la voie de signalisation Wnt. Le chevauchement de l'expression des gènes *Pax3* et *Cdx* se passe lors de l'induction de la crête neurale à la plaque neurale postérieure aussi bien que pendant la formation du tube neural et des cellules de la crête neurale. Les résultats préliminaires par CHIP ont montré la présence physique de Flag-*Cdx1* et Flag-EnRCdx1 sur le promoteur proximal de *Pax3*. Notre étude par RT-PCR sur la régulation de l'expression de *Pax3* par les facteurs de transcription *Cdx* a démontré la régulation endogène de *Pax3* par ces protéines dans les cellules Neuro2a. L'essai Luciférase montre l'induction de l'expression de *Pax3* par la surexpression des protéines *Cdx* et la diminution de son expression par la surexpression du dominant négatif EnRCdx1 dans les cellules Neuro2a. Après avoir identifié les sites potentiels de liaison pour les protéines *Cdx* sur le promoteur proximal de *Pax3*, nous avons procédé à une délétion des différentes régions de ce promoteur. On a remarqué la forte induction du promoteur au niveau de NCE (Neural Crest Enhancer). Pourtant, la mutation en combinaison de ces sites n'a pas montré la diminution de l'activité de ce promoteur. Étant donné la présence d'un site potentiel de liaison pour Brn1 sur le promoteur proximal de *Pax3*, notre étude par l'essai Luciférase a mis en évidence une synergie entre les co-facteurs *Cdx2* et Brn1 dans les cellules Neuro2a. Le même phénomène a été observé dans les cellules P19. Pourtant, la mutation du site de Brn1 n'a pas diminué l'activité du promoteur proximal de *Pax3*. En conclusion, nos résultats mettent en évidence la non fonctionnalité des sites de liaison pour les facteurs de transcription *Cdx* sur le promoteur proximal de *Pax3* ainsi que la synergie entre la protéine *Cdx2* et son co-facteur Brn1 dans les cellules Neuro2a ce qui suggère que la régulation directe de *Pax3* par les protéines *Cdx* n'implique pas de liaison des *Cdx* à l'ADN.

Mots clés: Neurulation, tube neural, crête neurale, neuroectoderme, système nerveux, voie de signalisation Wnt, transcription, facteur de transcription

## INTRODUCTION

Chez les vertébrés, le développement précoce du système nerveux comprend la coordination de plusieurs processus suivant l'induction neurale de l'ectoderme. La formation du tube neural (précurseur du système nerveux central (SNC)) est étroitement liée avec l'acquisition de caractéristiques antérieures-postérieures et l'élongation postérieure de même qu'avec l'induction d'une sous-population de cellules neur ectodermales appelées cellules de la crête neurale. Les cellules de la crête neurale sont des cellules multipotentes qui forment entre autres le système nerveux périphérique et le squelette cranio-facial.

Des problèmes affectant l'un ou l'autre de ces processus peuvent mener à des défauts de fermeture du tube neural, comme le spina bifida ou le craniorachischisis, qui représentent le second groupe de malformations congénitales chez l'homme. Des problèmes affectant les cellules de la crête neurale sont aussi à la base de nombreux syndromes génétiques, malformations congénitales et cancers chez l'homme, qui sont regroupés sous le terme neurocristopathies.

Afin de mieux comprendre ces problèmes développementaux chez l'humain, il a fallu les reproduire expérimentalement chez un modèle animal ayant des caractéristiques semblables à l'homme. Vu l'étendue de la ressemblance génétique entre l'homme et la souris, cette dernière a été considérée comme le modèle idéal à utiliser. Par conséquent, la souris est de nos jours le modèle de prédilection pour l'étude des anomalies de la neurulation humaine autant au niveau physiologique que moléculaire.

Des études récentes ont mis en évidence une implication directe de plusieurs voies de signalisation y compris la voie Wnt pour le développement de la crête neurale et du tube neural (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008; Basch et al., 2006; Goulding et al., 1991). Bien que plusieurs études ont été faites sur la voie de signalisation Wnt et la régulation de *Pax3*, le lien entre les deux n'a jamais été étudié. Jusqu'à présent, les recherches ont porté sur la régulation des gènes *Cdx* par les

facteurs de transcription de la voie Wnt.

L'objectif de ce projet de maîtrise est de caractériser la régulation de l'expression du gène *Pax3* par les facteurs de transcription Cdx.

Dans ce travail sont exposés les résultats des études des caractéristiques de la régulation de *Pax3* par les protéines Cdx. Le premier chapitre a pour but de donner un aperçu de l'état de connaissance des mécanismes et des voies de signalisation qui ont un impact sur cette régulation. Les matériels et les méthodes utilisés pour ce travail de recherche sont présentés dans le deuxième chapitre. Dans le troisième chapitre, nous étudierons les caractéristiques de la régulation de *Pax3* par les protéines Cdx. Une discussion sur les résultats obtenus est présentée dans le quatrième chapitre. Une conclusion générale fera la synthèse des principaux résultats obtenus au cours de ce travail.

## CHAPITRE I

### ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1.1 Développement précoce du système nerveux

##### 1.1.1 Neurulation

La neurulation est un événement de l'embryogenèse très important chez les vertébrés qui permet la formation d'une première ébauche du système nerveux à partir du neuroectoderme. Au cours de la neurulation, la plaque neurale sera distinguable à partir du jour embryonnaire (e) 7,5. La neurulation culmine dans la formation du tube neural qui est le précurseur du cerveau et de la moelle épinière (Schoenwolf et Smith, 1990). La neurulation se fait à partir d'une région spécialisée de l'ectoderme appelée la plaque neurale. Ce processus implique la formation de plis neuraux bilatéraux suivi de leur élévation et de leur fusion au niveau de la ligne médiale. La formation du neuroectoderme se fait par le déclenchement de signaux verticaux à partir du mésoderme. Au cours de deux étapes, l'axe antéro-postérieur (AP) de la plaque neurale sera spécifié (Gamse et Sive, 2000). Ces étapes consistent en l'induction de la plaque neurale antérieure et en sa postériorisation. Le tube neural sera ensuite recouvert par l'ectoderme épidermal (Lawson et Pederson, 1992; Garcia-Martinez et al., 1993).

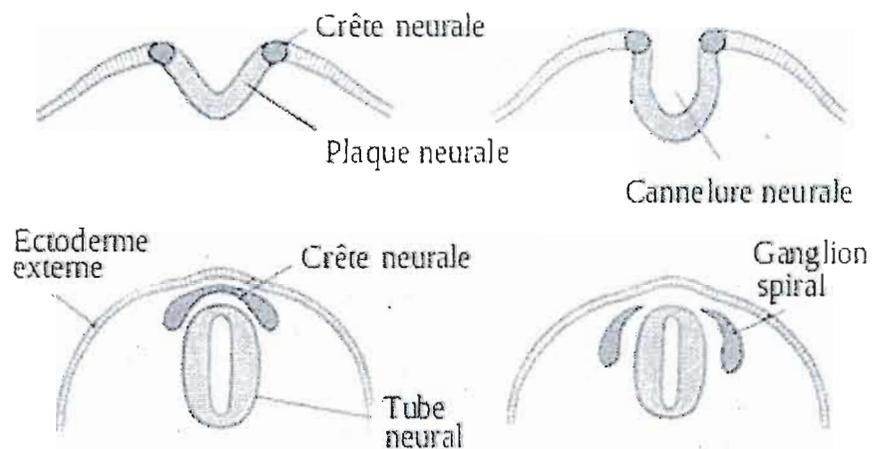
##### 1.1.2 Tube neural

Au cours de la neurulation, le développement du SNC est suivi par la différenciation régionale tout au long de l'axe AP. Ce processus génère le cerveau antérieur (prosencephalon), le cerveau moyen (mesencephalon), le cerveau postérieur

(rhombencephalon) et la moelle épinière (Gilbert, 2006).

La fermeture du tube neural chez les vertébrés se fait lorsque les plis neuraux s'approchent l'un à l'autre au niveau de la ligne médiane dorsale (Sadler, 1985; Pyrgaki et al., 2010) (fig. 1.1). Cette fermeture commence au niveau du quatrième et cinquième somite au stade e8 à e8,5 et est suivie d'une fusion rostrale et caudale à partir du site initial. Au cours des stades de 15 à 20 somites et 32 somites, la fermeture du tube neural se complète (Nagy et al., 2003).

La différenciation du tube neural aux régions variées du SNC peut être observée de trois manières. Au niveau anatomique, le tube neural forme les chambres du cerveau et la moelle épinière. Au niveau tissulaire, les cellules dans les parois du tube neural forment les différentes régions du cerveau et de moelle épinière. Au niveau cellulaire, les cellules neuroepithéliales se différencient en cellules neurales (neurones) et cellules de support (gliales) (Gilbert et al., 2006). Le changement de la partie antérieure du tube commence avant la formation de la région postérieure du tube neurale.



**Figure 1.1: Ectoderme neural et formation du tube neural (Sadler, 1985).**

La diversité régionale du tube neural a été largement étudiée par plusieurs groupes de recherche. En ce qui concerne l'organisation segmentale du cerveau antérieur, l'expression spatio-temporelle de plusieurs gènes y compris *Otx1*, *Otx2*, *Emx1*, *Emx2* et les membres des familles Wnt ("Wg (wingless) and Int-related"), Pax et Pou ont un impact (Holland et al., 1992; Simeone et al., 1992). Au niveau cellulaire, la différenciation des neurones spécifiques suit le mode dorsoventral (DV). Les neurones moteurs sont localisés ventralement dans la moelle épinière, alors que les neurones commisuraux et la crête neurale se situent au niveau dorsal. Les gènes des familles Pax et Lhx (*Lim*) sont impliqués dans ce positionnement DV (Tsuchida et al., 1994). Les gonflements le long du tube neural, dits les neuromères, sont les origines de l'organisation segmentale. Les neuromères du cerveau postérieur, ou rhombomères, ont été décrits dans un premier temps chez le poulet (Lumsden, 1991). Cette étude a montré que les rhombomères interagissent avec les nerfs craniaux et les ganglions sensoriels, mais également qu'ils influencent la migration des cellules de la crête neurale aux arches branchiales adjacentes (Nagy et al., 2003).

La postériorisation du tube neural est une étape importante dans la formation du SNC chez les vertébrés. Plusieurs études ont montré l'impact des gènes *Hox* sur la postériorisation du tube neural (Hombria & Lovegrove, 2003; Deschamps & van Nes, 2005). Une étude a montré que les facteurs de transcription Hox et Pax contrôlent la régionalisation AP et DV du tube neural (Nolte et al., 2006). Les voies de signalisation Wnt et FGF ("fibroblast growth factor") sont impliquées dans la caudalisation du tissu neural. En effet, ces signaux s'intègrent afin de réguler le développement du cerveau moyen, le rhombomère 1 du cerveau postérieur et la moelle épinière (Altmann & Brivanlou, 2001; Partanen, 2007; Roelink & Nusse, 1991). Par ailleurs, d'autres études ont montré le rôle des signaux SHH (Sonic Hedgehog) et BMP ("bone morphogenetic proteins") dans la régionalisation DV du tube neural (Lee & Pfaff, 2001; Murashov et al., 2004; Panchision & McKay, 2002). Une autre recherche a montré que les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR) sont nécessaires pour la régionalisation AP (Shiotsugu et al., 2004). En effet, les RAR ont

un impact sur l'expression des marqueurs postérieurs comme HoxB9 (Blumberg et al., 1997).

### 1.1.3 Crête neurale

Pendant la neurulation, une population de cellules neuroectodermales est aussi induite à former un groupe de cellules spécialisées aux extrémités latérales de la plaque neurale. Ces cellules sont appelées cellules de la crête neurale (Hall & Hörstadius, 1988 ; Le Douarin & Kalcheim, 1999). Suite à la neurulation, les cellules de la crête neurale se retrouvent donc dans la partie dorsale du tube neural duquel elles vont ensuite migrer afin de coloniser différentes régions de l'embryon. La perte de l'adhésion entre ces cellules, accompagnée de réarrangements cytosquelettiques et de changements morphologiques causent leur décollement et leur migration à partir du neuroépithélium.

Les cellules de la crête neurale migrent extensivement et se différencient en dérivés divers pour former entre autres le squelette cranio-facial et le système nerveux périphérique. Les cellules de la crête neurale sont multipotentes et donnent naissance à une variété de types cellulaires incluant des neurones (les nerfs craniaux sensoriels, parasymphatique, sympathique et les ganglions sensoriels), des cellules gliales, des cellules neuroendocrines, des cellules musculaires lisses des grands vaisseaux, les mélanocytes, des cellules osseuses et des cellules de cartilage (Thomas & Erickson, 2009; Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008). Les cellules de la crête neurale se regroupent dans deux catégories principales: cellules de la crête neurale craniale et cellules de la crête neurale du tronc. Les cellules de la crête neurale craniale migrent dorsolatéralement et elles forment le mésenchyme craniofacial et les mélanocytes, alors que les cellules de la crête neurale du tronc migrent dorsolatéralement et elles forment les mélanocytes ou elles migrent ventrolatéralement et elles forment les ganglions. Le positionnement axial des cellules de la crête neurale influence leur potentiel de développement car la crête neurale craniale donne naissance à l'os, le cartilage et les précurseurs de dents, alors

que crête neurale du tronc ne se différencie pas vers ces types cellulaires. Une étude a montré la migration des cellules de la crête neurale dans la souris par le marquage de la membrane plasmique des cellules avec un fluorophore hydrophobe (Serbedzija et al., 1990, 1991, 1992; Osumi-Yamashita et al., 1994). Les cellules de la crête neurale du tronc apparaissent entre les stades e8.5 et e10.5 (Serbedzija et al., 1990). Les cellules de la crête neurale migrent par la voie ventrale à travers la moitié rostrale des somites et la voie dorsolatérale entre le dermamyotome et l'épiderme (Serbedzija et al., 1991). La figure 1.2 révèle la migration des cellules de la crête neurale.

La majorité du système nerveux entérique est dérivée des cellules de la crête neurale vagale et sacrale qui se différencient en neurones et cellules gliales (Burns & LeDouarin, 1998). Les cellules de la crête neurale vagale sont dérivées du tube neural entre les somites 1 et 7, alors que les cellules de la crête neurale sacrale sont localisées postérieurement au somite 28 (Le Douarin and Teillet, 1973). Par ailleurs, la portion antérieure de la crête vagale, la crête cardiaque, est localisée entre la placode otique et le somite 3 (Kirby et al., 1983). La migration des cellules de la

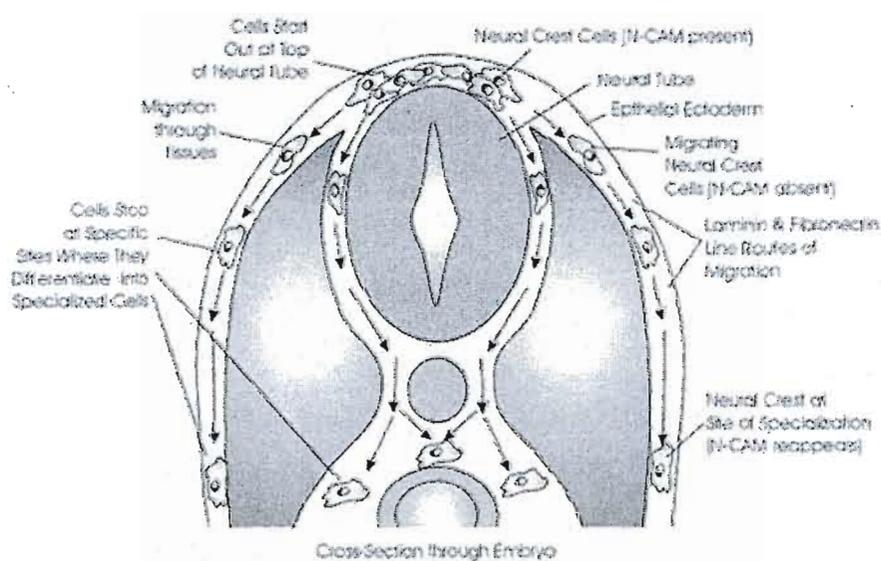


Figure 1.2: Migration des cellules de la crête neurale (Carlson, 2004).

crête neurale cardiaque a un impact sur le développement des mélanocytes et les arcs branchiaux qui contribuent au développement du cou et de la tête. L'importance des cellules de la crête neurale dans le développement du système cardiovasculaire a été montré pour la première fois en 1975 (Le Lièvre & Le Douarin, 1975). Plusieurs études ont montré le rôle des cellules de la crête neurale cardiaque dans la régionalisation des arcs branchiaux, la septation de l'aorte et l'artère pulmonaire et les maladies congénitales du cœur (Kirby et al., 1983; Kirby & Waldo, 1995; Kirby & Waldo, 1990).

#### **1.1.4 Contrôle moléculaire de l'induction des cellules de la crête neurale**

La population des cellules de la crête neurale est induite au cours du stade gastrula par les signaux produits par le mésoderme, la plaque neurale et l'épiderme (Selleck et Bronner-Fraser, 1996; Mancilla et Mayor, 1996; Marchant et al., 1998). Plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription sont connus comme ayant un impact sur le développement du tube neural et des cellules de la crête neurale. Dans le cas particulier des cellules de la crête neurale, un réseau régulateur de gènes contrôlant leur formation a récemment émergé (fig. 1.3). En effet, l'induction s'initie à la frontière de la plaque neurale et est médiée par le mésoderme et l'ectoderme non-neural. Toutefois, très peu de liens directs ont pu être établis à l'intérieur de ce réseau. Les événements de succession complexes permettant la formation des cellules de la crête neurale - de l'induction à la spécialisation et ensuite à la différenciation - se font par une cascade moléculaire comprenant de multiples modules régulateurs qui guident l'acquisition de propriétés comme la multipotentialité et la capacité migratoire. Ce réseau contient, entre autres, les voies de signalisation et les facteurs de transcription qui sont responsables de l'induction des cellules de la crête neurale et qui inclus: les voies postériorisantes Wnt et FGF de même que la voie de modelage DV BMP et les facteurs de transcription Pax3/7, Msx1/2 et Sox9/10. Parmi ces

signaux, ceux de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sont reconnus comme étant les plus importants et parmi ces facteurs de transcription, Pax3 (postérieurement) et Pax7 (antérieurement) sont connus comme étant les plus précocement actifs (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008; Basch et al., 2006). L'inhibition des signaux BMP combinée avec l'activation Wnt est nécessaire pour l'induction de la crête neurale (Hong et al., 2008; La Bonne et Bronner-Fraser, 1998). L'activité BMP s'éteint par les antagonistes de BMP (comme Noggin, Chordin et Follistatin) dans l'ectoderme. La crête neurale se forme après l'inhibition modérée de BMP, alors que la formation de la plaque neurale a besoin d'un haut niveau d'inhibition de BMP (Marchant et al., 1998; Meulemans & Bronner-Fraser, 2004). Le mécanisme de l'interaction de BMP et Wnt n'est pas clair. Néanmoins, un mécanisme possible d'action de la voie Wnt au cours de la postériorisation a été proposée (Villanueva et al., 2002; Wu et al., 2005). La co-injection des antagonistes de BMP avec les molécules comme les Wnt (Wnt7b ou Wnt8), les FGF (eFGF ou bFGF) ou l'acide rétinoïque (RA) causent la formation de la crête neurale dans les explants ectodermals (Mayor et al., 1995; LaBonne & Bronner-Fraser, 1998). La surexpression *in vivo* des régulateurs positifs des voies Wnt, FGF, RA développent les domaines formants la crête neurale, alors que l'inhibition de ces voies empêche l'induction de la crête neurale dans les embryons et les explants (Mayor et al., 1997; LaBonne & Bronner-Fraser, 1998). Les gènes *Pax3* et *Msx1/2* sont régulés par la voie Wnt, alors que les gènes *Zic1* et *Zic3* sont régulés à la frontière de la plaque neurale en réponse à l'atténuation du signal BMP (Meulemans & Bronner-Fraser, 2004). La figure 1.3 révèle le réseau de gènes impliqués dans le développement de la crête neurale.

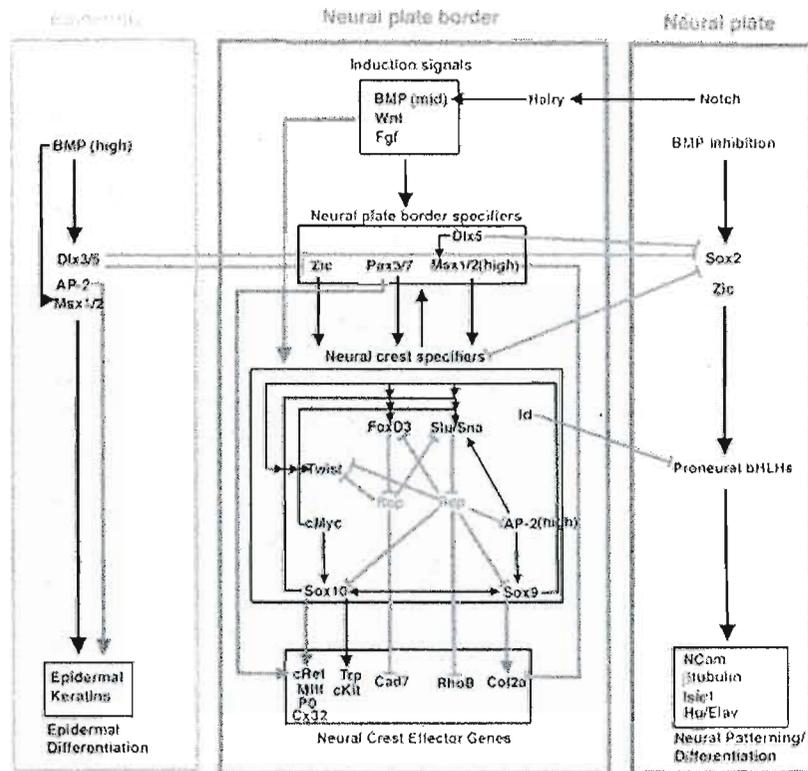


Figure 1.3: Réseau de gènes impliqués pour le développement de la crête neurale (Meulemans & Bronner-Fraser, 2004).

## 1.2 Le gène *Pax3*

Au cours de la neurulation chez la souris, la présence du gène *Pax3* est cruciale pour la fermeture du tube neural de même que pour le processus de l'induction des cellules de la crête neurale. Le gène *Pax3* est un gène à homéodomaine de la famille de gènes *Pax* qui sont exprimés au cours de l'embryogenèse des vertébrés. Les transcrits de *Pax3* ne se trouvent pas chez la souris adulte (Goulding et al., 1991). Le gène *Pax3* s'exprime d'abord au jour embryonnaire e8.5 dans le tube neural en formation et les cellules pré-migratoires de la crête neurale

ainsi que dans les somites (Goulding et al., 1991). L'expression de *Pax3* est ensuite maintenue dans le tube neural dorsal jusqu'au stade e12 (Goulding et al., 1991).

### 1.2.1 Différents rôles de *Pax3* dans le développement de la crête neurale

En plus de l'induction des cellules de la crête neurale, le gène *Pax3* a des différents rôles incluant la septation de l'aorte et l'artère pulmonaire, le développement des ganglions dorsaux, la formation des mélanocytes et le développement du système nerveux entérique. Quelques études ont montré que le gène *Pax3* a un rôle crucial dans la septation de l'aorte et l'artère pulmonaire (Conway et al., 1997; Degenhardt et al., 2010). Il a été montré que cette septation avait besoin du fonctionnement de *Pax3* dans la crête neurale cardiaque. Une étude récente a montré que l'interaction des facteurs de transcription *Foxd3* et *Pax3* est importante pour le développement de la crête neurale cardiaque. Ainsi, cette interaction affecte la survie et la maintenance des cellules progénitrices de la crête neurale cardiaque (Nelms et al., 2010). De plus, *Pax3* est important pour le développement de ganglions dorsaux (Koblar et al., 1999). D'autres auteurs ont mis en évidence un défaut de la migration de mélanocytes, ce qui donne le phénotype de tache blanche au ventre de la souris hétérozygote *Splotch* qui porte un allèle nul pour *Pax3* (Potterf et al., 2000). D'autres études ont montré que *Pax3* coopère avec *Sox10* afin d'induire l'expression de *MITF* qui code pour le facteur de transcription de *Microphthalmia* dans les mélanoblastes (les cellules de la crête neurale qui forment les mélanocytes) naissants (Watanabe et al., 1998; Bondurand et al., 2000; Potterf et al., 2000). De plus, l'empêchement de *Pax3* à s'attacher sur le promoteur de *MITF* par *FoxD3*, un répresseur transcriptionnel, résulte en la transdifférenciation des mélanoblastes aux cellules gliales (Thomas et Erickson, 2009). Par ailleurs, une autre étude a montré que *Pax3* et *Sox10* sont nécessaires pour la formation des ganglions entériques (Lang et al., 2000). Il a été montré que *Pax3* fonctionne avec *Sox10* afin d'activer la transcription de *c-RET*, un composant du développement de la crête

neurale entérique.

### 1.2.2 Régulation de l'expression de *Pax3*

Malgré l'importance critique de *Pax3* dans la fermeture du tube neural et de la crête neurale, on a peu d'information sur la régulation de son expression et en particulier concernant son induction. On sait toutefois que l'expression de *Pax3* est initiée en réponse à des signaux postériorisants, et qu'elle devient ensuite restreinte au niveau dorsal en réponse à des signaux de modelage DV (Monsoro-Burq et al., 2005; Bang et al. 1999; Natoli et al., 1997; Goulding et al., 1993). Il a en effet été démontré que pendant l'induction des cellules de la crête neurale, l'expression de *Pax3* est induite par les signaux postériorisants de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine mais le mécanisme moléculaire de cette régulation n'est pas connu (Monsoro-Burq et al., 2005; Bang et al. 1999).

Une étude a montré que le promoteur proximal de 1.6 kb de *Pax3* est suffisant pour l'expression de *Pax3* dans le tube neural et la crête neurale (Li et al., 1999). Une autre étude a montré que le promoteur proximal de *Pax3* contient les enhancers NCE de 674 bp suffisants pour récapituler le patron d'expression de *Pax3* dans la crête neurale. NCE ("neural crest enhancer") contient les deux régions NCE1 et NCE2 faisant chacun environ 250 bp et séparés par 156 bp (Milewski et al., 2004).

L'expression de *Pax3* est d'abord initiée dans la plaque neurale postérieure en réponse aux signaux postériorisants de la voie Wnt et devient ensuite limitée au tube neural dorsal en réponse aux signaux de modelage DV comme ceux de la voie SHH (Monsoro-Burq et al., 2005; Bang et al., 1999; Natoli et al., 1997; Goulding et al., 1993; Schnapp et al., 2005). Des sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription des familles Tead, Pbx-Hox et Pou ont aussi été caractérisés dans NCE (Milewski et al., 2004; Pruit et al., 2004).

Une étude sur la régulation de l'expression de *Pax3* montre que les gènes *Pax3* et *Tead2* sont co-exprimés dans le tube neural dorsal. Il a été aussi montré que

la protéine Tead2, un des membres de famille Tead, s'attache au site TGAATGTGT de la région NCE2. En effet, *Tead2* et son co-facteur *YAP65* sont co-exprimés dans le tube neural dorsal. Par ailleurs, la mutation du site de liaison pour Tead2 dans les constructions de *Pax3* de souris transgéniques supprime l'expression neurale. De plus, il a été montré par hybridation *in situ* que la mutation du site de liaison pour Tead2 sur NCE2 supprime l'activité du promoteur proximal de *Pax3* (Milewski et al., 2004).

Les gènes *Hox* et leur co-facteur *Pbx* contrôlent l'identité des segments du corps (Zhang et al., 1994; Gavalas et al., 1997; Bell et al., 1999; Davenne et al., 1999; Barrow et al., 2000). Les protéines de la famille *Hox* sont présentes sur le site B du promoteur de *Pax3* en formant des complexes avec la protéine *Pbx*. Le motif TGATTGAT de NCE2 est le site de liaison *Pbx/Hox* (Pruitt et al., 2004).

La protéine *Brn1* est un des membres de la famille *Pou* classe III qui est exprimée dans le cerveau et le rein (He et al., 1989). Les protéines *Brn2*, *Brn4* et *Oct6* sont les autres membres de cette famille protéique. Il a été démontré que les protéines de la famille *Pou* classe III sont présentes sur le promoteur du gène *Pax3*. Les protéines *Brn1* et *Brn2* s'attachent sur le site TTAATTA et le site TTTATTA de NCE2. Il a été aussi montré que la mutation de ces sites de liaison pour les protéines *Pou* classe III dans la souris transgénique entraîne une réduction de l'expression du gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle du promoteur proximal de *Pax3* au niveau du tube neural (Pruitt et al., 2004).

Toutes ces études démontrent toutefois que ces facteurs de transcription sont actifs dans la maintenance plutôt que dans l'induction de l'expression de *Pax3*. Les sites *Tead*, *Pbx*, *Pou* ne peuvent donc pas être impliqués dans l'induction de *Pax3* via la voie *Wnt*.

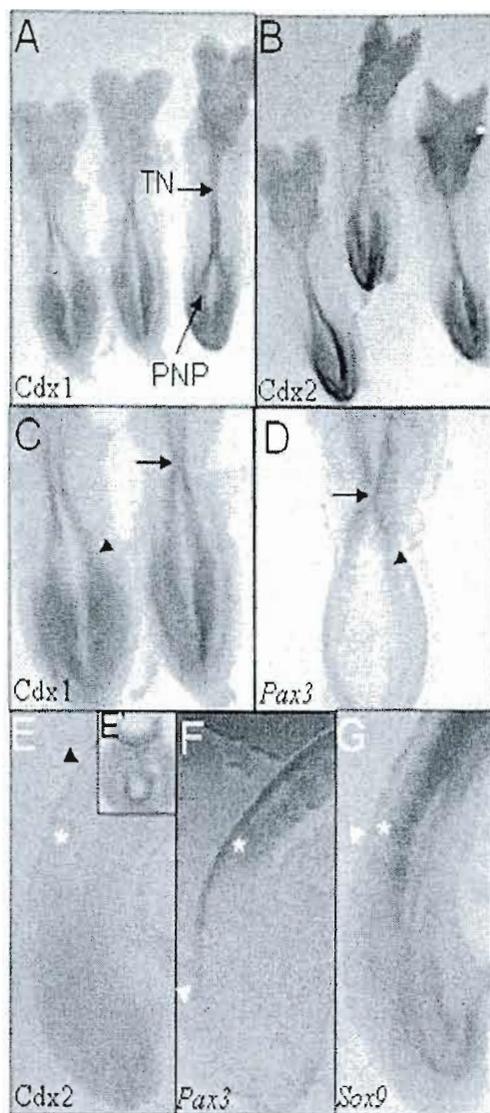
### 1.3 Induction de *Pax3* par la voie *Wnt*: rôle des protéines *Cdx*

Le mécanisme de l'induction de l'expression de *Pax3* par la voie *Wnt* n'est pas bien compris. Une étude a montré qu'aucun site *Lef/Tcf* n'est identifié dans le

promoteur de *Pax3* et des essais de co-transfection dans les cellules Neuro2a ont montré qu'un gène rapporteur Pax3p1.6kb-Luciférase (supportant l'expression neurale de *Pax3*) ne peut être que très modestement induit par le complexe Lef1/ $\beta$ -caténine (1.4x) (N. Pilon, résultats non montrés). Cela suggère que l'induction de *Pax3* par les signaux Wnt se fait de manière indirecte. Plusieurs observations suggèrent que les protéines Cdx pourraient agir comme intermédiaires entre la voie Wnt canonique et *Pax3* (fig. 1.6 et fig. 1.8).

### **1.3.1 Patron d'expression des Cdx dans le neuroectoderme et les cellules de la crête neurale**

Les protéines Cdx (Cdx1, 2 et 4) sont des facteurs de transcription à homéodomaine qui sont connus entre autres pour leur capacité à relayer les signaux postériorisants (FGF, Wnt) sur le promoteur des gènes *Hox* (Lohnes, 2003). Le patron d'expression des protéines Cdx au cours de la formation du tube neural et de la crête neurale a été étudié. Au cours du développement embryonnaire de la souris, les transcrits et les protéines Cdx sont d'abord détectés dans les cellules de l'ectoderme et du mésoderme vers le stade e7.5 (Meyer & Gruss, 1993; Gamer & Wright, 1993; Beck et al., 1995). À e8.5, les gènes *Cdx* sont tous fortement exprimés au niveau de la plaque neurale postérieure ainsi que dans le tube neural en développement (fig. 1.4). À ce stade, il y a un chevauchement presque parfait entre le patron d'expression de Cdx1 et Cdx2 dont la limite antérieure atteint une région correspondant à la frontière entre le futur cerveau postérieur et la future moelle épinière (fig. 1.4.A, B). À ce stade, il y a aussi co-expression des protéines Cdx avec le gène *Pax3* (fig. 1.4.C, D). Cette limite antérieure régresse pendant l'élongation postérieure de l'embryon et persiste jusqu'au stade e10.5 pour Cdx1 et Cdx4 et jusqu'au stade e12.5 pour Cdx2. Il est aussi intéressant de noter que cette limite antérieure chevauche le domaine postérieur d'expression des marqueurs *Pax3* et *Sox9* car les domaines du chevauchement de l'expression de ces gènes correspond au domaine d'induction des



**Figure 1.4: Patron d'expression de Cdx**

**1, Cdx2, Pax3 et Sox9.** (A,B)

L'immunohistochimie montre la distribution des protéines Cdx1 (A) et Cdx2 (B) dans des embryons au stade e8.5. Il existe un chevauchement au niveau de la plaque neurale postérieure et du tube neural. (C-D) La distribution de la protéine Cdx1 est comparée avec le domaine d'expression du gène *Pax3* tel que détecté par hybridation in situ. Un chevauchement est détecté au niveau du site d'initiation de fermeture du tube neural (flèche) et aux extrémités latérales de la plaque neurale postérieure (pointe de flèche).

(E-G) Comparaison de la distribution de la protéine Cdx2 (E) avec les domaines d'expression des gènes *Pax3* (F) et *Sox9* (G) à l'extrémité caudale d'embryons au stade e9.5 (vue latérale). L'emplacement du dernier somite formé

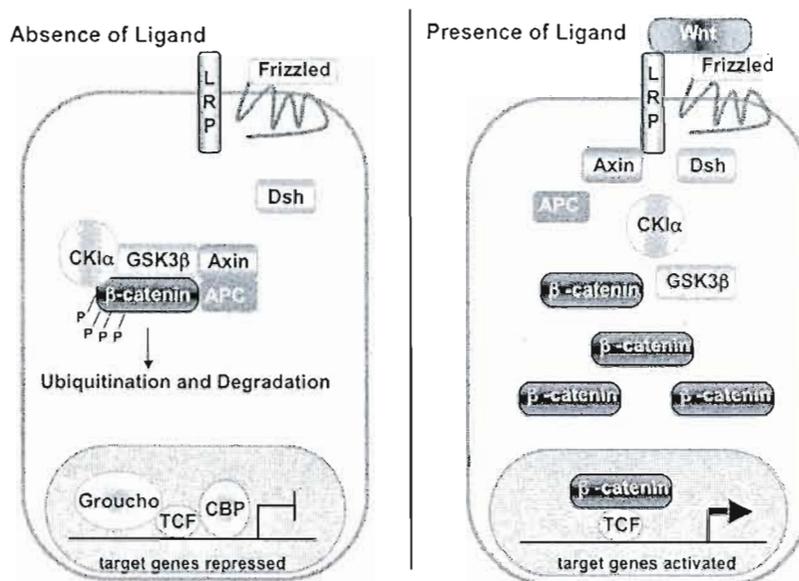
est indiqué par un astérisque. Les protéines Cdx se trouvent toutes au moins jusqu'au 3<sup>ème</sup> dernier somite formé comme c'est montré ici pour Cdx2 (flèche noire dans E). Notez le chevauchement entre le domaine antérieur de la distribution de la protéine Cdx2 et le domaine postérieur de l'expression des gènes *Pax3* et *Sox9* (flèches blanches dans F et G).

cellules de la crête neurale. De plus, *Pax3* est un marqueur plus précoce par rapport à *Sox9* car le domaine d'expression de *Pax3* est plus postérieur par rapport à celui de *Sox9* (fig. 1.4.E, F et G) (N. Pilon, résultats non publiés).

### 1.3.2 Contrôle de l'expression des gènes *Cdx* par les signaux Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est la voie la plus importante pour l'induction des cellules de la crête neurale et l'expression des gènes *Cdx*. Les protéines Wnt sont une famille de glycoprotéines sécrétées et riches en cystéine. Au cours de l'activation de la voie Wnt canonique, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique se stabilise et est transférée au noyau où elle s'associe avec les facteurs de transcription de la famille LEF/Tcf (LEF1, Tcf1, Tcf3 et Tcf4) afin d'activer la transcription de gènes cibles (Moon et al., 2002; Logan et Nusse, 2004; Eisenmann, 2005) (fig. 1.5). En effet, en absence des signaux Wnt,  $\beta$ -caténine est phosphorylée par le complexe CKI $\alpha$ , GSK3 $\beta$  et axine ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation dans le cytoplasme. Dans ce contexte, TCF qui lie le site consensus (A/T) (A/T)CAAAG(G/C) (Roose et al., 1999) interagit avec les co-répresseurs Groucho et CBP afin de réprimer l'expression des gènes cibles. En présence des signaux Wnt,  $\beta$ -caténine ne subit pas de phosphorylation et dégradation. Son accumulation dans le cytoplasme de la cellule est suivie par son déplacement dans le noyau.  $\beta$ -caténine remplace les co-répresseurs pour interagir avec TCF, ce qui résulte en la transcription des gènes cibles.

La voie Wnt canonique a un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes *Cdx* dans le mésoderme et le neuroectoderme. En effet, il a été démontré que *Cdx1* et *Cdx4* sont des cibles directes de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Pilon et al., 2006; Pilon et al., 2007). La co-localisation de LEF1 et  $\beta$ -caténine sur les promoteurs de *Cdx1* et *Cdx4* a été démontré par des essais d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP). De plus, dans les embryons *Wnt3a<sup>vu/vt</sup>* l'expression de *Cdx1* et *Cdx4* est réduite (Ikeya & Takada, 2001; Pilon et al., 2006). Il a aussi été démontré



**Figure 1.5: Stabilisation de  $\beta$ -caténine dans le noyau de la cellule par la voie Wnt (Eisenmann, 2005).**

que les signaux Wnt activent, au moins indirectement, l'expression neurale de *Cdx2* (Nordstorm et al., 2006). De plus, les protéines Cdx peuvent interagir fonctionnellement et physiquement avec le complexe de transcription  $\beta$ -caténine-Lef/Tcf afin d'activer la transcription via des éléments de réponse Lef/Tcf (LRE) (Béland et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc que les protéines Cdx peuvent relayer les signaux de la voie Wnt canonique pendant l'induction des cellules de la crête neurale. Comme mentionné précédemment, un candidat intéressant comme un gène cible des protéines Cdx régulé par la voie Wnt dans le neuroectoderme est *Pax3* (Basch et al., 2006; Mansouri et al., 1996; Monsoro-Burq et al., 2005).

### 1.3.3 Fonctions neurales des protéines Cdx

Malgré le fait que l'expression des gènes *Cdx* dans le neuroectoderme est hautement conservée chez les chordés, les fonctions neurales des protéines Cdx sont encore peu connues. Étant donné le fort chevauchement de leur patron d'expression, cette situation est probablement le reflet de la redondance fonctionnelle entre les protéines Cdx (Savory et al., 2009; van den akker et al., 2002; van Nes et al., 2006). Toutefois, l'analyse de leur patron d'expression suggère que les protéines Cdx pourraient avoir un rôle important dans la fermeture du tube neural et l'induction des cellules de la crête neurale.

En accord avec cette hypothèse, on observe chez la souris que la surexpression des protéines Cdx dans le tube neural et les somites sous le contrôle du promoteur *RARβ* peut causer un défaut de fermeture du tube neural (Charité et al., 1998). De plus, l'analyse de souris double-mutantes *Cdx1<sup>-/-</sup> Cdx2<sup>+/-</sup>* montre que les protéines Cdx peuvent aussi influencer le développement des cellules de la crête neurale puisque les ganglions dorsaux de ces souris sont malformés et fusionnés (van den Akker et al., 2002). Enfin, chez les embryons ascidiens, une perte de fonction Cdx cause à la fois un défaut du tube neural (Mita & Fujiwara, 2007) et l'absence des cellules de pigment, qui sont dérivées des cellules comme celles de la crête neurale (Jeffery et al., 2004; Katsuyama et al., 1999).

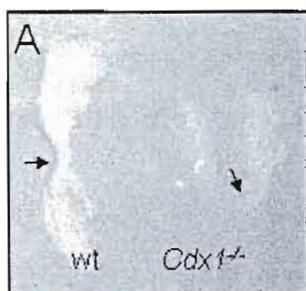
### 1.4 Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires par hybridation *in situ* de l'ARNm ont montré que le gène *Pax3* est co-exprimé avec les protéines Cdx dans l'embryon caudal (Fig. 1.4) et que l'expression de *Pax3* est réduite d'une façon significative dans le tube neural dorsal d'un embryon *Cdx1<sup>-/-</sup>* de 6 somites (Fig. 1.6) (N. Pilon, résultats non publiés).

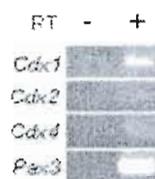
Par ailleurs, une analyse par RT-PCR a aussi démontré que les gènes *Cdx* sont co-exprimés avec *Pax3* dans les cellules Neuro2a, qui sont dérivées de la crête neurale (Fig. 1.7) (N. Pilon, résultats non publiés). Récemment, un autre groupe de

recherche a aussi trouvé par RT-PCR l'expression de *Pax3* dans les cellules Neuro2a (Leon et al., 2009).

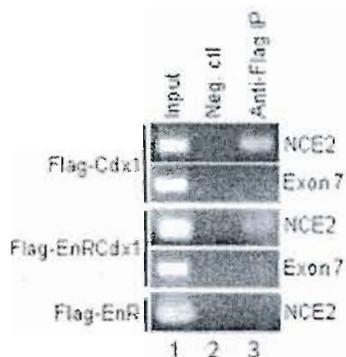
Enfin, une expérience par ChIP dans les cellules Neuro2a a montré que soit Flag-Cdx1 ou Flag-EnRCdx1 peut occuper la région NCE2 de *Pax3* endogène (Fig. 1.8) (N. Pilon, résultats non publiés).



**Figure 1.6: Expression de *Pax3* dans les embryons de type sauvage (gauche) et sans *Cdx1* (droite) au stade 6 somites (e8.25).** Notez la réduction de l'expression dans le tube neural (flèches) de l'embryon mutant. Les embryons ont été traités et colorés parallèlement.



**Figure 1.7: L'analyse par RT-PCR de la co-expression de *Pax3* avec les gènes *Cdx* dans les cellules Neuro2a.** Le contrôle négatif sans RT (gauche), la co-expression des gènes *Cdx1*, *Cdx2*, *Cdx4* et *Pax3* (droite).



**Figure 1.1:** Essai d'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules Neuro2a démontrant que les protéines Flag-Cdx1 ou Flag-EnRCdx1 peuvent occuper la région NCE2 du promoteur *Pax3* endogène. Des oligonucléotides flanquants Pax3NCE2 (ou exon7 comme un contrôle négatif) ont été utilisés afin d'amplifier l'ADN immunoprécipité avec un anticorps anti-Flag des cellules Neuro2a transfectées avec Flag-Cdx1, Flag-EnRCdx1 ou Flag-EnR. Un produit de PCR pour NCE2 a été obtenu des cellules transfectées avec Flag-Cdx1 et Flag-EnRCdx1 mais pas des cellules transfectées avec le contrôle négatif Flag-EnR. La piste 1 représente un échantillon de chromatine avant immunoprécipitation, la piste 2 représente un contrôle négatif pour l'immunoprécipitation (sérum pré-immun) et la piste 3 représente l'ADN immunoprécipité par anti-Flag.

## 1.6 Hypothèses et objectifs

### 1.6.1 Hypothèses

1. Au cours de la neurogenèse caudale précoce, les facteurs de transcription Cdx relaient les signaux Wnt canoniques.
2. Les facteurs de transcription Cdx agissent comme intermédiaires entre la voie Wnt et *Pax3*.
3. Les interactions Wnt/Cdx sont importantes pour l'initiation de l'expression de *Pax3* et l'induction des cellules de la crête neurale.
4. *Pax3* est une cible directe des facteurs Cdx.

### 1.6.2 Objectifs

1. Le premier objectif de ce travail est de confirmer la régulation de l'expression de *Pax3* par les protéines Cdx.
2. Le deuxième objectif de ce travail est de caractériser la régulation de l'expression de *Pax3* par les protéines Cdx.

## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Culture cellulaire

Les cellules de neuroblastomes Neuro2a qui sont dérivées de la crête neurale, sont maintenues dans le milieu EMEM (Wisent, Canada) avec 10 % de FBS (Wisent, Canada), penicillin (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL) et cultivées à 37 °C dans l'atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules de carcinomes embryonnaires P19, qui sont des cellules non-différenciées, sont maintenues dans le milieu DMEM avec les mêmes suppléments et dans les mêmes conditions de culture que les cellules Neuro2a.

#### 2.2. Construction de Pax3p1.6 kb -Luciférase

L'analyse du promoteur de *Pax3* chez des souris transgéniques a mis en évidence des régions régulatrices dans le promoteur de 1.6 kb suffisantes pour contrôler son expression dans le tube neural et la crête neurale (Milewski et al., 2004; Natoli et al., 1997). Deux courtes régions d'environ 240 pb, appelées NCE, sont connues comme les éléments activateurs suffisants pour induire l'expression de *Pax3* dans les cellules de la crête neurale (Milewski et al., 2004). Tel que décrit auparavant, le promoteur *Pax3* de 1.6 kb a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique (Li et al., 1999). Pour les essais de co-transfection, ce produit de PCR fut ensuite cloné dans le vecteur rapporteur Luciférase pXP2 (Nordeen, 1988).

#### 2.3 Construction de EnRCdx1

Un dominant négatif Cdx (EnRCdx1) a été généré par fusion du domaine de répression de la protéine Engrailed (de *Drosophila*) et le domaine d'attachement de

l'ADN (homéodomaine) de Cdx1. L'homéodomaine des protéines Cdx étant fortement conservé, EnRCdx1 reconnaît les gènes cibles de chaque protéine Cdx et peut inhiber leur expression. Afin d'ajouter un épitope Flag en N-terminal, les séquences de EnRCdx1 ont été sous-clonées dans le vecteur pCEP4-Flag.

L'efficacité du dominant négatif Flag-EnRCdx1 à inhiber la transactivation des gènes par les protéines Cdx a été démontrée dans les cellules d'embryocarcinome F9 en utilisant un vecteur rapporteur d'activité Cdx contenant un activateur de *Hoxb8* commandant l'expression de Luciférase (Béland et al., 2004). Le dominant négatif Flag-EnRCdx a, en effet, diminué l'expression de Luciférase induite par Cdx dans ce système. La spécificité d'inhibition de Flag-EnRCdx1 est de plus démontrée par le fait qu'une construction contrôle permettant la surexpression de Flag-EnR seul (sans l'homéodomaine de Cdx1) n'a pas d'effet sur la transactivation médiée par Cdx (N. Pilon, résultats non montrés).

## 2.4 Régulation endogène

Dans un premier temps, l'importance des facteurs de transcription Cdx dans la régulation de *Pax3* endogène est évaluée dans les cellules Neuro2a.

L'effet d'une surexpression des protéines Cdx1, Cdx2 et Cdx4 et du dominant négatif Flag-EnRCdx1 sur les niveaux d'expression de *Pax3* est analysé en utilisant la technique de RT-PCR (semi-quantitatif) pour évaluer la présence des transcrits.

### 2.4.1 Transfection de constructions plasmidiques

La transfection de constructions plasmidiques permettant la surexpression de Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnRCdx1 et Flag-EnR seul (contrôle négatif) est réalisée avec la trousse Effectene (Qiagen). Ces constructions sont générées par sous clonage des ADNc correspondant dans le vecteur pIRES2-EGFP (Clontech) qui permettent aussi la co-expression de GFP (Green Fluorescence Protein) sous le contrôle du promoteur CMV (Cytomegalovirus).

Les transfections sont faites dans des pétris de 10 cm contenant  $4 \times 10^5$  cellules Neuro2a respectivement afin d'obtenir 40-80% de confluence. La transfection des plasmides se fait selon les directives du kit Effectene avec 1  $\mu\text{g}$  d'ADN pour les pétris de 10 cm et 120 ng d'ADN pour les boîtes de 24 puits. Les cellules sont récupérées après 48 h d'incubation à 37 °C (2 séries de transfection) et les cellules transfectées (GFP-positives) sont obtenues par FACS ("fluorescence activated cell sorting"). Le tout est suivi par l'extraction de l'ARN et le RT-PCR pour l'analyse des transcrits *Pax3*.

#### **2.4.2 Microscopie de fluorescence**

Pour déterminer le rendement de transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de GFP, une imagerie de fluorescence est effectuée par un microscope de fluorescence Nikon Eclipse TI.

#### **2.4.3 Triage des cellules**

Le triage des cellules Neuro2a nous a permis de séparer les cellules GFP positives des cellules non fluorescentes par un appareil de FACS Vantage Becton Dickinson. En moyenne, le rendement de marquage des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de GFP a été d'environ 30 %.

#### **2.4.4 Extraction de l'ARNm**

Pour chaque échantillon de cellules Neuro2a transfectées, l'ARNm est extrait à partir d'un nombre équivalent de cellules obtenues par FACS ( $5 \times 10^5$ ) à l'aide du kit Oligotex mRNA (Qiagen).  $5 \times 10^5$  cellules GFP positives sont directement récupérées et lysées dans 600  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse OL1 lors du tri par FACS. 30  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté pour chaque 1 mL du tampon OL1 avant l'utilisation. La liaison d'ARNm, via sa queue polyA, sur les billes de résine qui sont recouvertes

d'oligo(dT) et l'élimination des ARNt sont suivies par l'élution de l'ARN.

Les ARNm des cellules Neuro2a et P19 sont extraits des cellules non transfectées selon le même protocole du kit Oligotex mRNA (Qiagen).

#### 2.4.5 RT-PCR

La technique de RT-PCR est effectuée avec la trousse Superscript II RT (Invitrogen) de la manière suivante :

Un volume de réaction de 20  $\mu$ L est utilisé pour 50 ng d'ARNm.

Les composants suivants sont ajoutés à un tube de microcentrifugation sans nucléase : 1  $\mu$ L d'oligo dT18 (500  $\mu$ g/  $\mu$ L), 50 ng d'ARNm, 1  $\mu$ L dNTP Mix (10 mM chacun) et de l'eau distillée stérile. Le mélange est chauffé à 65 °C pendant 5 minutes pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN et est incubé dans la glace. 4  $\mu$ L de tampon First-Strand 5x, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M et 1  $\mu$ L de l'inhibiteur de RNase RNaseOut (Invitrogen) sont ajoutés suivie d'une incubation à 42 °C pendant 2 minutes pour permettre l'attachement de l'oligo dT18 à la séquence poly A de l'ARNm. 1  $\mu$ L (200 unités) de SuperScript II RT est ajouté. L'échantillon est incubé à 42 °C pendant 50 minutes pour la synthèse de l'ADNc. Ensuite, la réaction est inactivée en chauffant à 70 °C pendant 15 minutes.

Un fragment de l'ADNc de *Pax3* (287 pb) est amplifié par PCR avec les oligonucléotides suivants qui sont désignés pour passer par dessus un intron afin de détecter une possible contamination par l'ADN génomique par la présence d'un produit de PCR plus grand:

5'-CTGCCAACATACCAGCTGTCG-3' (sens)

5'-CCACCGTGGTTGGTCAGAAGTC-3' (antisens)

Pour la normalisation, un PCR est aussi fait pour GAPDH (530 pb) avec les oligonucléotides suivants:

5'-TCCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3' (sens)

5'-AGGTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (antisens)

L'amplification PCR est faite en utilisant l'ADN polymérase Go Taq (Promega). Pour chaque condition de transfection initiale, un échantillon de la réaction de PCR est recueilli à 15, 20, 25 et 30 cycles de 35 secondes à 96 °C, 30 secondes à 61 °C et 45 secondes à 72 °C.

Afin d'identifier les facteurs présents dans les cellules Neuro2a et P19, une PCR est effectuée sur les ADNc avec les oligonucléotides suivants:

Sox2.A

5'-TGTCGCACATGTCAGGGCTGGAC-3' (sens)

Sox2.1

5'-CGCCCTCAGGTTTTCTCTGTACAA-3' (antisens)

Brn1.A

5'-GGACATCTCGTTTATACTGTGGTG-3' (sens)

Brn1.1

5'-CCCAAAGACTTGAATATGGCCAAG-3' (antisens)

Brn2.A

5'-TTGGAAGAGGCAGACTCATCCTCG-3' (sens)

Brn2.1

5'-AGTTAGAGGGAAAACAGAGGTCCC-3' (antisens)

Brn4.A

5'-TCCTGCCACGATCTCTGACTGGA-3' (sens)

Brn4.1

5'-TGCGTGCGTGTTTGCCTGAGCG-3' (antisens)

Oct6.A

5'-TGTGCAGTGACCCTGCGGACTG-3' (sens)

Oct6.1

5'-ATTCTGGATCTTCCGCTGCTCTC-3' (antisens)

L'amplification PCR est faite en utilisant l'ADN polymérase Platinum Taq (Invitrogen) à 35 cycles de 30 secondes à 96 °C, 30 secondes à 62 °C et 45 secondes à 68 °C.

Ensuite, les produits de PCR sont fractionnés selon leur taille sur un gel d'agarose 1.5% contenant du bromure d'éthidium 0.001% baignant dans une solution de TAE IX (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM; pH 8,0). Le temps de la migration des échantillons dans le gel d'agarose varie en fonction de la taille des fragments à séparer et de la concentration du gel. Le marqueur de taille déposé est le "100 pb ladder" (Biobar) pour estimer la taille d'un fragment. Après migration, le gel éclairé aux UV est photographié par une caméra CCD. La mesure de l'intensité des bandes a été effectuée à l'aide du programme Image.

#### **2.4.6 Extraction des protéines cellulaires**

Pour l'extraction des protéines cellulaires, les cellules Cos7 non transfectées ou transfectées avec un des plasmides d'expression de Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnR ou Flag-EnRCdx1 sont centrifugées à 7000 rpm pendant 30 secondes et les culots sont resuspendus dans 200 µL du tampon TpTx-100 déjà gardé sur glace (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EGTA 1 mM, Triton Tx-100 1%, Glycérol 10%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Aprotinin 1 µg/mL, Leupeptin 1 µg/mL, Pepstatin 1

µg/mL). Les échantillons sont incubés dans la glace pour 15 minutes, ensuite les échantillons sont centrifugés pendant 30 minutes à 13000 rpm, les surnageants sont récupérés. Pour le dosage des protéines, le kit Bio-Rad Dc protein assay est utilisé.

### **2.4.7 Analyse de l'expression des protéines Cdx et Pax3**

#### **2.4.7.1 Électrophorèse des protéines sur le gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)**

Les protéines cellulaires (50 µg) sont séparés sur un gel d'entassement (0.13 M Tris-HCl pH 6.8, 5% acrylamide, 0.13% bis-acrylamide, 0.1% de SDS, 0.1% persulfate d'ammonium (PSA), 0.1% TEMED (N, N, N', N'-tetraméthyléthylènediamine)) et ensuite un gel de séparation (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 10% acrylamide, 0.3% bis-acrylamide, 0.1 % de SDS, 0.1% PSA, 0.04 % TEMED).

Les échantillons de protéines totales extraites des cellules Cos7 dans un tampon de chargement (100 mM Tris-Hcl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycérol, 100 mM DTT et 0.2% bromophénol) sont dénaturés pendant 5 min à 95°C puis chargés sur le gel. La migration est réalisée à 125 volts pendant 2 heures dans du tampon d'électrophorèse (25 mM Tris-base, 250 mM glycine, 0.1 % SDS).

#### **2.4.7.2 Transfert de protéines**

Après la migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de Polyvinylidène difluoride (PVDF) préalablement trempée dans le méthanol pendant 15 secondes puis réhydratée dans l'eau. Le transfert est effectué dans un appareil (Biorad) pendant la nuit à 25 volts dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 192 mM glycine, 20% méthanol).

### 2.4.7.3 Immunobuvardage

Le blocage de la membrane PVDF contenant les protéines Cdx1, Cdx2, Flag-EnR, Flag-EnRCdx1 et Gapdh est fait pendant 1 heure à température de la pièce dans une solution de blocage de lait/TBST (10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween, lait écrémé en poudre 5%). Pour le blocage de la membrane de PVDF avec les protéines Cdx4 et Pax3, le lait spécial (20 mM Tris-HCl pH7.4, 0.16 M NaCl, 0.1% Tween, lait écrémé en poudre 8%) au lieu de lait/TBST est utilisé. Le western blot est fait avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-Pax3 commercial (C-20, Santa Cruz biotechnologie Inc.) ou avec un anticorps polyclonal de lapin anti-Cdx4 (M-168, Santa Cruz biotechnologie Inc.) dilué dans le lait spécial ou avec un anticorps polyclonal de lapin anti-Cdx1 ou anti-Cdx2 fournis par le laboratoire du Professeur David Lohnes ou polyclonal anti-Gapdh (FL-335, Santa Cruz biotechnologie Inc.) ou monoclonal de souris anti-Flag (Santa Cruz Biotechnology Inc.) dilués dans le lait/TBST suivi d'une incubation pour 1 heure à la température de la pièce. Les dilutions des anticorps sont faites selon le tableau supplémentaire III. Le lavage de la membrane est fait 3 fois 5 minutes dans le lait/TBST ou le lait spécial. Ensuite, le deuxième anticorps couplé à la HRP ("Horseradish Peroxidase") soit les anticorps polyclonal de chèvre anti-lapin (403005 Cedarlane) ou polyclonal de chèvre anti-souris (Santa Cruz Biotechnologies Inc.) ou polyclonal de lapin anti-chèvre (Santa Cruz Biotechnology Inc.) sont ajoutés dans le lait/TBST ou le lait spécial, selon le milieu des anticorps primaires utilisés, suivi d'une incubation pendant 1 h à la température de la pièce. Le lavage de la membrane est fait 3 fois 5 minutes dans le lait/TBST ou 2 fois dans le lait spécial suivi d'un lavage pendant 5 minutes dans le TBS 1x pour le cas du lavage dans le lait spécial. Enfin, le lavage de la membrane avec le substrat de chimioluminescence de HRP (Amersham Biosciences) est effectué suivi de la détection Enhanced ChemiLuminesce (Amersham Biosciences) à l'aide d'un film autoradiographique (Kodak).

## 2.5 Fonctionnalité des sites potentiels

### 2.5.1 Mutagenèse et co-transfections

Les résultats préliminaires présentés à la figure 6 et l'analyse MatInspector des séquences du promoteur *Pax3* ont démontré qu'il existe une corrélation entre la transactivation faite par la protéine Cdx2 et la présence de 3 sites potentiels de liaison potentiels au niveau des NCE (1 site (#1) dans NCE1 et 2 sites (#2 et 3) dans NCE2). La fonctionnalité de ces 3 sites potentiels de liaison est tout d'abord étudiée par mutagenèse dirigée afin de générer de nouveaux rapporteurs Luciférase du promoteur *Pax3* de 1.6 kb. La mutagenèse des sites de liaison potentiels est réalisée avec la trousse QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) et les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 1 (pour la mutation du site #1) :

**ATAAA** consensus

5'-CAGGAAAAATTCAAATATCATA**CA**AGAAAAGGGAACTTGAAGCC-3'

Oligonucléotide 2 (pour la mutation du site #2) :

**TTTAT** consensus

5'-CAGCTCCTAGCCAAGACGTTGCTTCTT**CC**ATTTTTCCAGCAGTTT-3'

Oligonucléotide 3 (pour la mutation du site #3) :

**ATAAA** consensus

5'-AGTCTGAATGCCATAATACCTT**CC**TGAGAACAAACGCTGCACCCG-3'

Les deux cytosines en italique dans chacun des oligonucléotides sont les sites mutés par rapport à la séquence du promoteur de *Pax3* contenant la séquence consensus.

Afin de muter chaque site individuellement ou en combinaison, 10 pmol de chacune des combinaisons d'oligonucléotides mutés, 2.5 µL du tampon 10X, 0.5 µL

de Quick solution, 2.5 U d'enzyme, de dNTP et le volume approprié de l'eau distillée stérile sont ajoutés dans chacun des tubes de PCR pour avoir le volume total de 25  $\mu$ L. Ensuite la PCR est effectuée pour 30 cycles des 3 étapes suivantes : 1 minute à 95 °C, 1 minute à 55 °C et 16 minutes à 65 °C. Suite à la PCR, 1  $\mu$ L de l'enzyme DpnI (dépendante de méthylation) est ajouté dans les échantillons qui seront incubés à 37 °C pendant 1 heure pour faire la digestion du plasmide parental qui est méthylé.

Après avoir fait la transformation des bactéries E. coli et miniprep, la présence des mutations dans les plasmides extraits des bactéries est confirmée par le séquençage (Génome Québec).

Afin de vérifier la fonctionnalité des sites de liaison pour les protéines Cdx au niveau de NCE et ensuite au niveau de NCE2, 2 séries du sous clonage sont faites. Tout d'abord, pour obtenir les mutations dans les NCEs, les plasmides produits de la 1<sup>ère</sup> mutagenèse sont amplifiés par un PCR avec les oligonucléotides suivants:

5'-AGATCTTTGAGTTTGCCTTAATTAGGGGGTG-3'

5'-AAGCTTCCCTTCTGAGAAGCGGGGACTTTAAA-3'

L'amplification PCR est faite en utilisant l'ADN polymérase Advantage2 (Clontech) à 35 cycles de 30 secondes à 96 °C, 30 secondes à 62 °C et 45 secondes à 68 °C.

Le plasmide ayant la séquence de NCE2 ayant les mutations au niveau des 2 sites de liaison pour les protéines Cdx est ensuite amplifié par un autre PCR avec les oligonucléotides suivants:

5'-CTCGAGGCTACTGGCAAAGGTGCTCACT-3'

5'-AGATCTGGCACAATGGTACCTTCTCTAAGG-3'

L'amplification PCR est faite en utilisant l'ADN polymérase Platinum Taq

(Invitrogen) à 40 cycles de 30 secondes à 96 °C, 30 secondes à 62 °C et 45 secondes à 68 °C.

Après avoir laissé migrer les échantillons des PCR sur un gel d'agarose de 2%, les bandes sont extraites avec le QIAquick Gel Extraction Kit. Ensuite, les ligations des différents produits de PCR purifiés avec le vecteur pGEM-T sont faites. La transformation des bactéries *E. coli* avec les plasmides des 2 ligations est suivie de l'isolement des plasmides par miniprep. Les échantillons de digestion des minipreps positifs sont laissés migrer sur un gel d'agarose de 1%, une extraction des bandes d'intérêts est faite avec le QIAquick Gel Extraction Kit suivie des ligations appropriées.

Les nouvelles constructions Pax3p1.6kb-Luciférase, Pax3NCE-Luciférase et Pax3NCE2-Luciférase sont analysées par co-transfection avec Cdx2 dans les cellules Neuro2a. Puisque la protéine Cdx2 transactive mieux *Pax3* dans les cellules Neuro2a (Fig. 3.5), la co-transfection de ces cellules avec Cdx2 est faite dans cette étude. La capacité de ces nouvelles constructions à être transactivées par Cdx2 est comparée à celle de Pax3p1.6kb-Luciférase d'origine. La co-transfection de Cdx2 + Pax3p1.6kb-Luciférase dans les cellules Neuro2a est faite tel que décrit dans la section "Régulation endogène" à la différence qu'elles sont réalisées dans une boîte de 24 puits.

Une autre mutagenèse est faite sur le site de liaison pour Brn1 au niveau de NCE2 avec la trousse QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) et l'oligonucléotide suivant:

**TAATAAA** consensus

5'-CAGCAGTTT**AGTCTGAATGCCATA***CGCAATTCCTGAGAACA*-3'

Les bases nucléiques cytosine-guanine-cytosine en italique dans l'oligonucléotide sont les sites mutés par rapport à la séquence de NCE2 contenant la séquence consensus.

Les transfections sont faites en triplicata et répétées trois fois. Pour chaque construction Pax3p1.6kb-Luciférase (mutée et non mutée), Pax3NCE-Luciférase

(mutée et non mutée), Pax3NCE2-Luciférase (mutée et non mutée) et Pax3POU-Luciférase (mutée et non mutée), 100 ng du rapporteur Luciférase sont co-transfectés avec 10 ng de Cdx2 ou du vecteur vide (pIRES2.EGFP). Les cellules sont incubées pendant 48 heures à 37 °C puis le protocole suivant est utilisé pour l'essai Luciférase.

### 2.5.2 Essai Luciférase

La lyse de  $5 \times 10^4$  cellules Neuro2a qui ont été transfectées dans les boîtes de 24 puits est préparée en mettant 200  $\mu$ L du tampon de lyse (Tris 0.1 M pH 8.0, NP-40 1%, 5  $\mu$ L de DTT 1 mM) dans chaque puit. L'essai de Luciférase est fait sur la lyse des cellules Neuro2a en mélangeant 20  $\mu$ L des extraits de cellules Neuro2a avec 100  $\mu$ L du tampon de l'essai de Luciférase (Glycyl glycine 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, KPO<sub>4</sub> pH 7.8 15 mM, EGTA pH 7.8 4 mM, ATP 2 mM, DTT 2 mM) par tube, ensuite on ajoutera 50  $\mu$ L de Luciférine (0.3 mg/mL). La préparation des échantillons de l'essai Luciférase est faite en triplicata. La quantification de la luminescence est faite avec un appareil EG&G Berthold Lumat LB 9507 suivi d'une normalisation des résultats par la quantité de protéines des échantillons analysés.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### **3.1. Les cellules Neuro2a expriment la protéine GFP 48 h après les transfections**

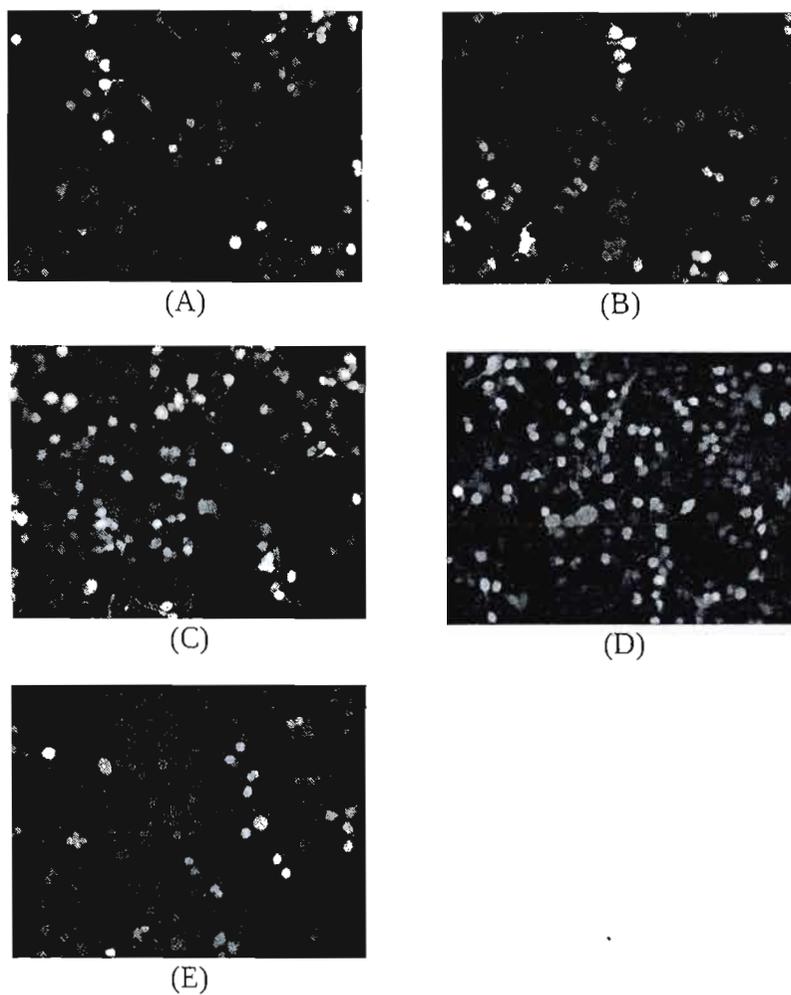
Tout d'abord, dans le but de vérifier la morphologie, la viabilité et le rendement du marquage des cellules Neuro2a transfectées avec les plasmides d'expression de GFP ayant les séquences d'une de protéines Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnRCdx1 ou Flag-EnR, nous avons analysé les images des cellules par la microscopie de fluorescence à 24 h et 48 h après les transfections. Le marquage des cellules Neuro2a avec GFP était peu visible après 24 h de transfection, mais elle était observable 48 h après les transfections. Les cellules étalées dans les pétris de 10 cm et les boîtes de 24 puits étaient viables après avoir été transfectées avec 5 µg de plasmides d'expression de GFP. Afin de déterminer le rendement du marquage des cellules Neuro2a, la technique de FACS a été utilisée. 30% à 40% des cellules étaient GFP positives (fig. 3.1.A à E).

#### **3.2 Immunobuvardage des protéines Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnRCdx1, Flag-EnR extraites des cellules Cos7**

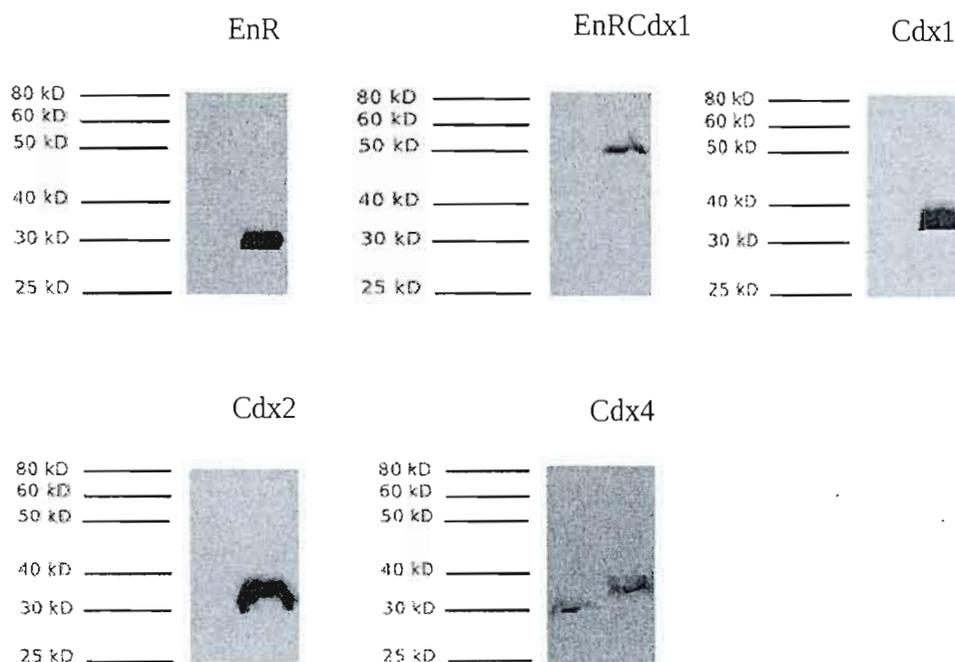
Afin de vérifier si les protéines Cdx1, Cdx2, Cdx4, Flag-EnRCdx1 et Flag-EnR s'expriment dans les cellules suite à une transfection de leur plasmide d'expression IRES-EGFP, une analyse par immunobuvardage a été faite 48 h après transfections dans les cellules Cos7. Ces protéines ont été observées sur la membrane de PVDF (fig. 3.2.).

#### **3.3 Les facteurs de transcription Cdx régulent l'expression de Pax3 endogène**

Dans le but d'étudier la régulation de l'expression du gène *Pax3* par les facteurs de transcription Cdx (Cdx1, 2 et 4) dans les cellules Neuro2a, les

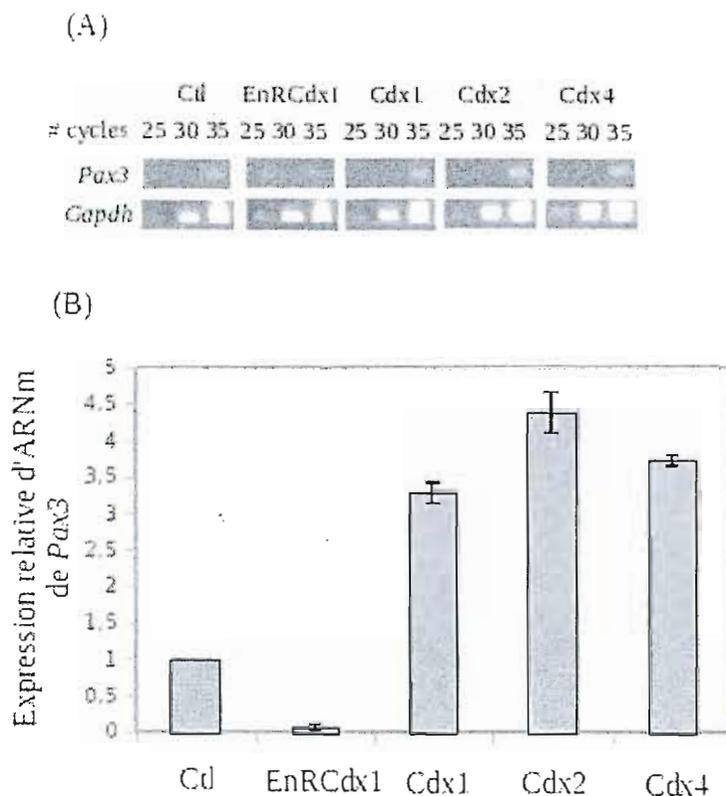


**Figure 3.1: Marquage des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression des Cdx ou du dominant négatif Flag-EnRCdx1.** Les cellules Neuro2a transfectées avec les plasmides d'expression de (A) Flag-EnRCdx1, (B) Flag-EnR, (C) Cdx1, (D) Cdx2 et (E) Cdx4 (n=3 pour les échantillons).



**Figure 3.2: Expression des protéines Flag-EnR, Flag-EnRCdx1, Cdx1, Cdx2 et Cdx4 dans les cellules Cos7 mesurée par Western blot.** Les échantillons d'extraits protéiques des cellules Cos7 non transfectées sont les contrôles représentés à gauche de chaque échantillon dans l'image des gels (n=1). La protéine détectée dans le contrôle pour Cdx4 observée à 30 kD ne correspond pas à la protéine Cdx4.

transfections de ces cellules dans les plaques de 10 cm ont été faites avec les plasmides d'expression des Cdx. 48 h après transfection et triage par FACS, les ARNm extraits des cellules GFP positives ont permis de mesurer l'expression de *Pax3* par RT-PCR semi-quantitatif. La RT-PCR utilisant les amorces spécifiques pour *Pax3* démontre une surexpression significative de l'ARNm de *Pax3* endogène dans les cellules Neuro2a transfectées avec les plasmides d'expression de Cdx1, Cdx2 et



**Figure 3.3: Régulation de l'expression de l'ARNm de *Pax3* dans les cellules Neuro2a suite aux transfections avec chacun des plasmides d'expression des Cdx (Cdx1, 2 et 4) et de Flag-EnRCdx1.** (A) L'expression d'ARNm de *Pax3* mesurée par RT-PCR semi-quantitatif 48 h après la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression des Cdx (Cdx1, 2 et 4) et le dominant négatif EnRCdx1. (B) Analyse des niveaux d'expression d'ARNm de *Pax3* endogène. Le niveau d'expression d'ARNm à 35 cycles a été quantifié par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de *Gapdh*. L'expression de *Gapdh* a été incluse comme un contrôle interne. Ctl représente l'extrait d'ARNm de cellules transfectées avec Flag-EnR servant de contrôle négatif. (n=3 pour les échantillons).

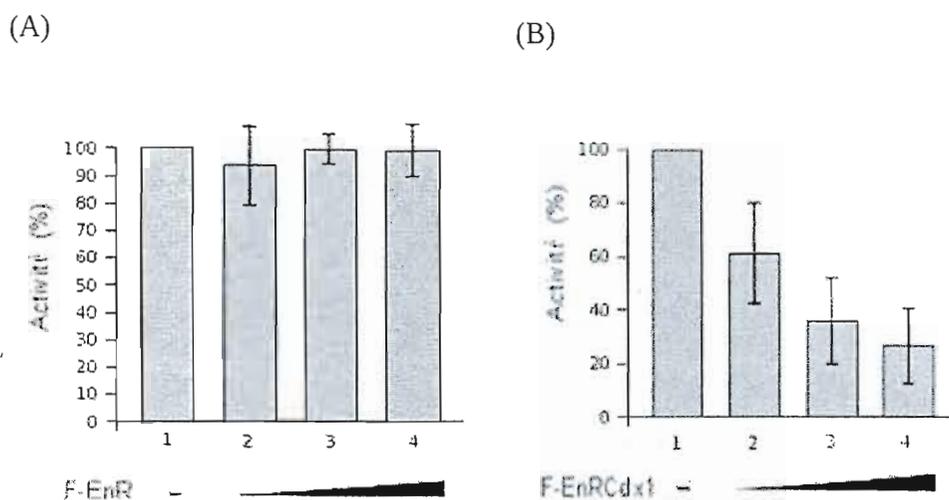
Cdx4 ainsi qu'une diminution de son expression dans les cellules Neuro2a transfectées avec le plasmide d'expression du dominant négatif Flag-EnRCdx1 (fig. 3.3.A). *Gapdh* a servi comme un contrôle interne (fig. 3.3.A). Les expressions de l'ARNm de *Pax3* endogène dans les cellules Neuro2a transfectées avec les plasmides d'expression de Cdx1, Cdx2, Cdx4 et EnRCdx1 ont été comparées dans le diagramme suivant (fig. 3.3.B). Donc, les résultats confirment que les Cdx augmentent l'expression de *Pax3* endogène, alors que le dominant négatif la diminue.

#### **3.4 L'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase augmente en présence des protéines Cdx et diminue en présence de Flag-EnRCdx1 en fonction de la concentration**

Afin de vérifier si les Cdx augmentent l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase et si le dominant négatif Flag-EnRCdx1 la diminue dans les cellules Neuro2a, les échantillons de transfection de ces cellules avec les plasmides d'expression des Cdx et du dominant négatif dans les boîtes de 24 puits ont été analysés par l'essai Luciférase 48 h après les transfections. Le plasmide d'expression de Flag-EnR est utilisé comme contrôle négatif afin de vérifier si l'expression de *Pax3* ne diminue pas en présence du domaine répresseur de EnR seul. Tel qu'attendu, l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase n'a pas changé suite à la transfection des cellules Neuro2a avec le plasmide d'expression de Flag-EnR (fig. 3.4.A) et elle a diminué en présence de Flag-EnRCdx1 (fig. 3.4.B), alors que l'augmentation en fonction de la concentration de son expression en présence des Cdx suivie d'une diminution en présence de Flag-EnRCdx1 ont été observées (fig. 3.5.A, B et C).

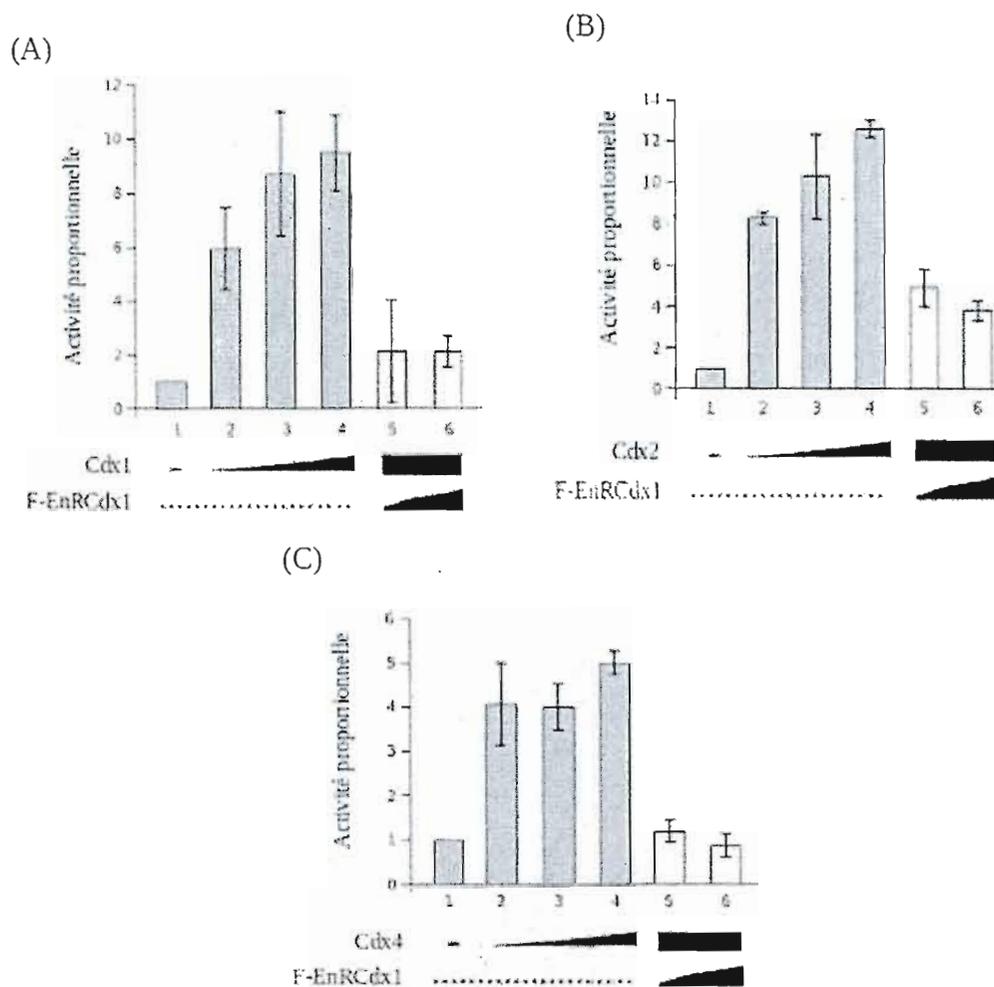
#### **3.5 La fragmentation du promoteur proximal de Pax3 montre une réponse à Cdx2 au niveau de NCE1 et NCE2**

Pour analyser les sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3*, le logiciel MatInspector a été utilisé. Cette analyse a suggéré la présence de 4 sites potentiels pour les Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3* dans la région des NCEs (un site sur NCE1 et 2 sites sur NCE2) ainsi que dans

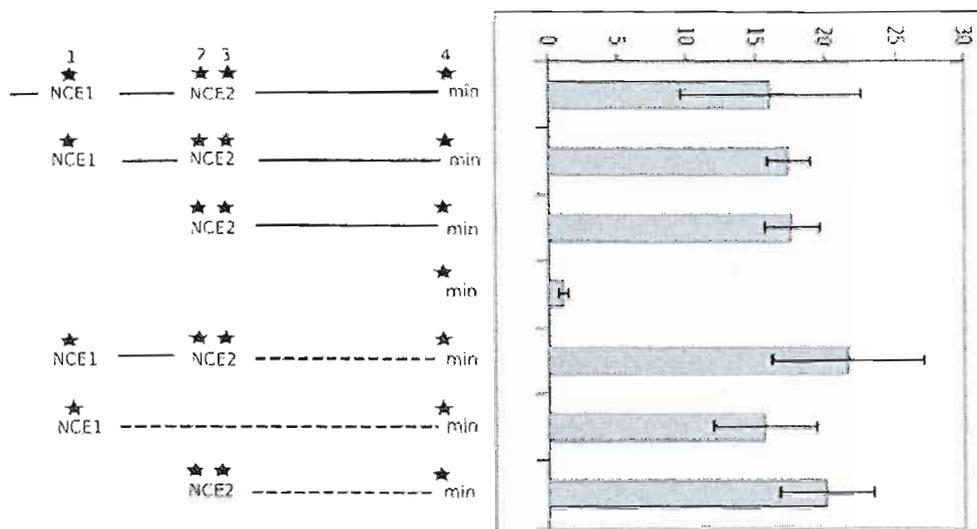


**Figure 3.4: Régulation de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase suite à la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Flag-EnRCdx1 ou Flag-EnR.** Effet spécifique du dominant négatif EnRCdx1 sur l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase dans les cellules Neuro2a. Notez (A) l'absence de changement en présence du contrôle négatif Flag-EnR et (B) la diminution en fonction de la concentration de l'expression du gène rapporteur en présence de Flag-EnRCdx1 (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.

le promoteur minimal, un promoteur dont la présence est nécessaire pour l'expression de *Pax3*. Pour vérifier l'activité des sites de liaison pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3*, des délétions de ce promoteur ont été faites suivies d'essais Luciférase. Les domaines de réponse aux protéines Cdx ont été localisés au niveau de NCE1 et NCE2, préalablement décrits (Milewski et al., 2004) (fig. 3.6).



**Figure 3.5: Régulation de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase suite à la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Flag-EnRCdx1 et des protéines Cdx (Cdx1, 2 et 4). Effet de l'addition de (A) Cdx1, (B) Cdx2, (C) Cdx4 et F-EnRCdx1 sur l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase. Notez l'augmentation en fonction de la concentration de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase en présence des protéines Cdx (2 à 4) et la diminution de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase en présence de Flag-EnRCdx1 et des protéines Cdx (5 et 6) (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.**



★ Site potentiel de liaison pour les protéines Cdx

**Figure 3.6: Activité des fragments du promoteur proximal de *Pax3* en réponse à *Cdx2*.** Notez l'activité maximale du promoteur proximal de *pax3* au niveau des NCEs et son activité minimale au niveau du promoteur minimal (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.

### 3.6 Les mutations des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx ne diminuent pas une réponse du promoteur proximal de *Pax3* à *Cdx2*

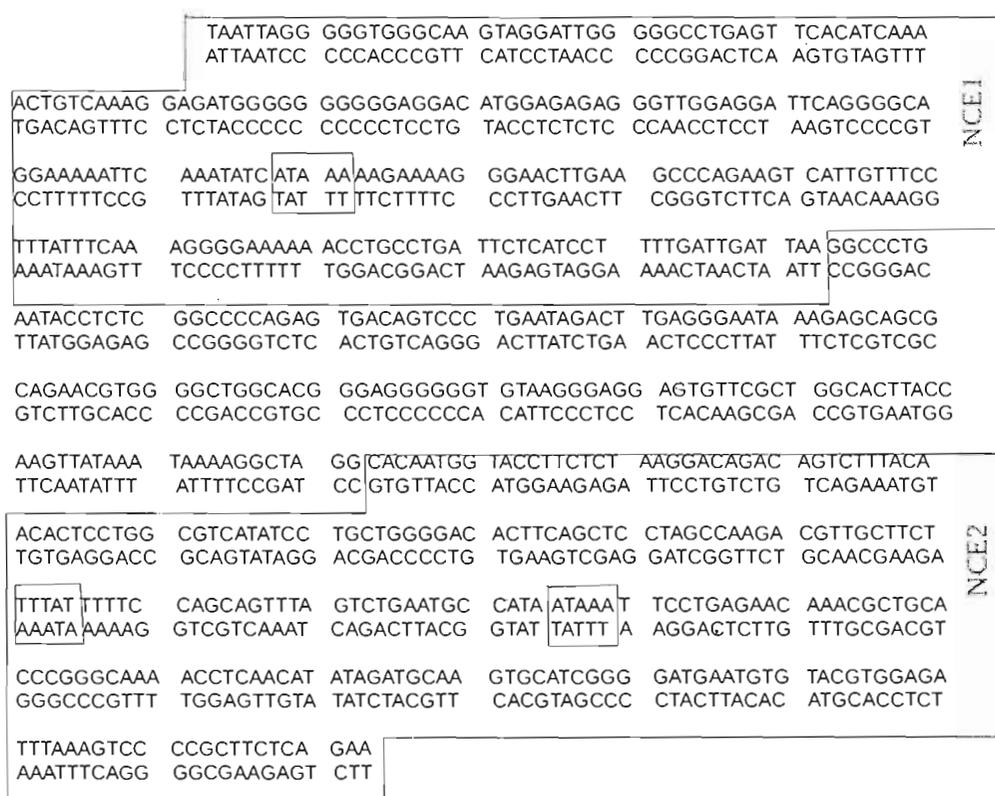
Pour étudier l'effet de mutation sur les sites potentiels de liaison des facteurs de transcription Cdx1, 2 et 4 dans les NCE (NCE1 (1 site) et NCE2 (2 sites) du promoteur proximal de *Pax3*, les transfections des cellules dans les boîtes de 24 puits ont été faites avec les plasmides d'expression des Cdx et les plasmides ayant les mutations en combinaison des 3 sites de liaison des Cdx sur le promoteur proximal 1.6 kb de *Pax3*. 48 h après les transfections, les échantillons ont été étudiés par essai Luciférase afin de mesurer l'activité du promoteur proximal 1.6 kb de *Pax3*. La

séquence de NCE est comparée avec les oligonucléotides ayant plusieurs mutations pour l'étude de fonctionnalité des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx (fig. 3.7). Toutefois, la simple, double ou même triple mutation des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sur ce promoteur ne montre pas de changement au niveau de l'activité (résultats non montrés et fig. 3.8.A). On a donc émis l'hypothèse de la présence de sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx en dehors de la région des NCEs du promoteur 1.6 kb de *Pax3* afin de diminuer la zone d'analyse de ces sites. On s'est alors focalisé à étudier l'effet de mutagenèse des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx au niveau des NCEs seuls. Pour ce faire, cette région a été sous-clonée dans le vecteur PXP2, suivi de l'essai Luciférase. Cette expérience a montré que les mutations des 3 sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sur NCE1 et NCE2 ne diminuent pas l'activité du promoteur proximal de *Pax3* au niveau des NCEs seuls (fig. 3.8.B). Ensuite, on a émis l'hypothèse de la présence de sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx dans la région de 156 bp entre NCE1 et NCE2. Donc, un autre sous clonage a été fait sur la région NCE2 seule ayant la mutation au niveau des 2 sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx dans le même vecteur, suivi par un essai Luciférase. Cette recherche n'a pareillement montré aucune diminution de l'activité de NCE2 en réponse à une protéine Cdx (fig. 3.8.C).

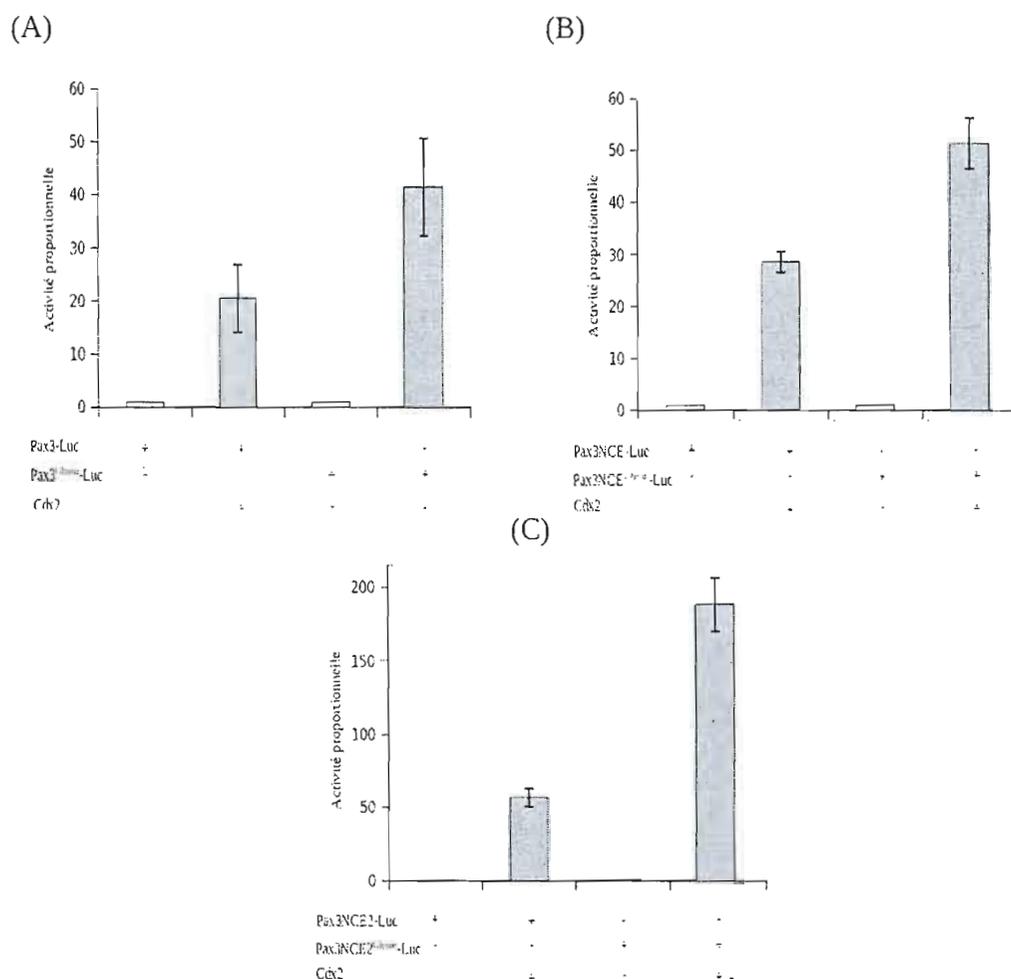
### **3.7 Les co-facteurs potentiels des Cdx sont régulés dans les cellules Neuro2a et P19**

Puisque les mutations des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx au niveau de NCE1 et NCE2 n'ont pas diminué l'activité du promoteur de *Pax3*, nous avons émis comme hypothèse l'existence de co-facteurs potentiels des Cdx qui sont exprimés dans les cellules Neuro2a. Plus précisément, il faut que les co-facteurs pour les Cdx soient présents dans les cellules Neuro2a et absents dans les cellules non-neurales car la transactivation du promoteur proximal de *Pax3* par les protéines Cdx fonctionne bien dans les cellules Neuro2a et beaucoup moins bien dans les cellules non-neurales comme les cellules P19 et F9 (résultats non montrés). On s'est intéressé

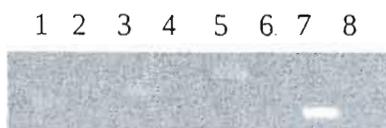
à étudier la présence des facteurs neuraux dans les cellules. Une étude par RT-PCR sur les cellules Neuro2a et P19 a montré que les transcrits de Brn1, Brn2, Brn4 et Sox2 sont présents dans les cellules Neuro2a (fig. 3.9). Parmi ces transcrits, seulement Sox2 est présent dans les cellules P19 (résultats non montrés).



**Figure 3.7: Séquence de NCE. Les NCE1 et NCE2 ainsi que les 3 sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sont identifiés.**



**Figure 3.8: Effet de la mutation des sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3*.** (A) L'activité du promoteur proximal de *Pax3* mesurée par l'essai Luciférase 48 h après la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Cdx2 et NCE ayant les 3 sites potentiels de liaison non mutés et mutés pour les protéines Cdx. L'activité du promoteur de *Pax3* ne diminue pas malgré la mutation des 3 sites de liaison pour les Cdx. Les mêmes résultats sont montrés pour (B) la région NCE et (C) la région NCE2 de ce promoteur (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.



**Figure 3.9: Régulation des co-facteurs potentiels des Cdx dans les cellules Neuro2a.** L'expression d'ARNm de (1) Sox2, (3) Brn1, (5) Brn2 et (7) Brn4 mesurée par RT-PCR sur les cellules Neuro2a. Les produits de PCR des échantillons contrôles de RT (sans l'enzyme RTase) pour Sox2, Brn1, Brn2 et Brn4 ont migré dans les pistes 2, 4, 6 et 8 respectivement.

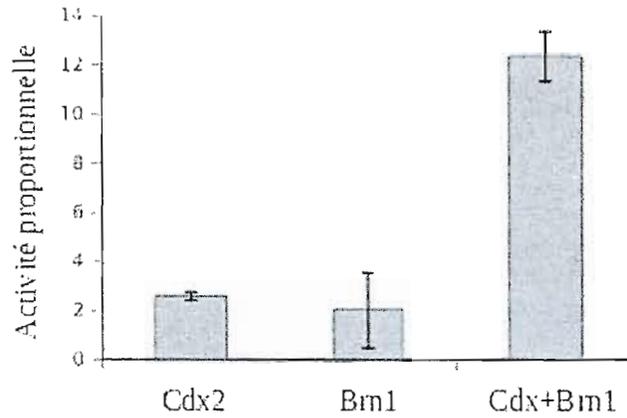
### 3.8 Une synergie existe entre les facteurs de transcription Cdx et Brn1 sur la région NCE2 de *Pax3*

Parmi les facteurs neuraux présents dans les cellules Neuro2a selon la figure 3.9, on s'est intéressé à étudier l'interaction entre Brn1 et Cdx2 car le site potentiel de liaison pour Brn1 se trouve dans la région de NCE2 sur le promoteur proximal de *Pax3* (Pruitt et al., 2004). L'interaction des protéines Cdx et Brn1 sur le promoteur proximal de *Pax3* a été analysée par l'essai Luciférase. Les échantillons de cellules Neuro2a transfectées avec les plasmides d'expression de Cdx2, Brn1 et la région NCE2 de *Pax3* ont été étudiés 48 h après les transfections. Une synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1 sur la région NCE2 de *Pax3* est observée pour les doses 1.25 ng de chacun des plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1 (fig. 3.10.A) et 2.5 ng de chacun de ces plasmides (fig. 3.10.B). Pour les doses des plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1 supérieures à 5 ng cette synergie n'a pas été observée. La synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1 a aussi été observée dans les cellules P19 (résultats non montrés).

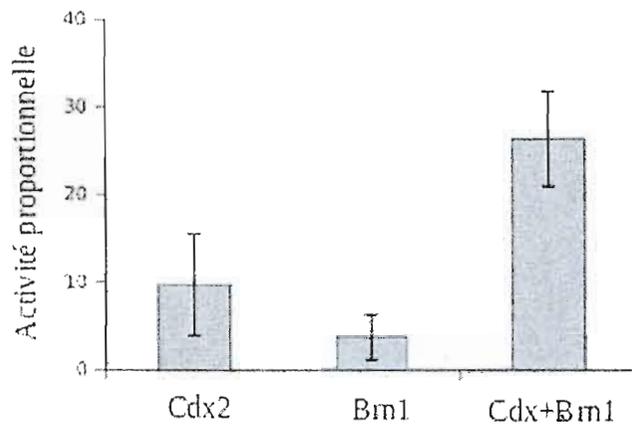
### **3.9 La mutation du site de liaison pour Brn1 ne diminue pas l'activité de la région NCE2 de Pax3**

L'activité de la région NCE2 de *Pax3* suite à la mutation du site de liaison pour Brn1 a été mesurée par l'essai Luciférase. Les expériences sur les cellules Neuro2a montrent que cette mutation ne change pas l'activité de ce promoteur 48 h après les transfections des cellules pour les doses de 1.25 ng de chacun des plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1 (fig. 3.11.A) et de 2.5 ng de chacun de ces plasmides (fig. 3.11.B).

(A)

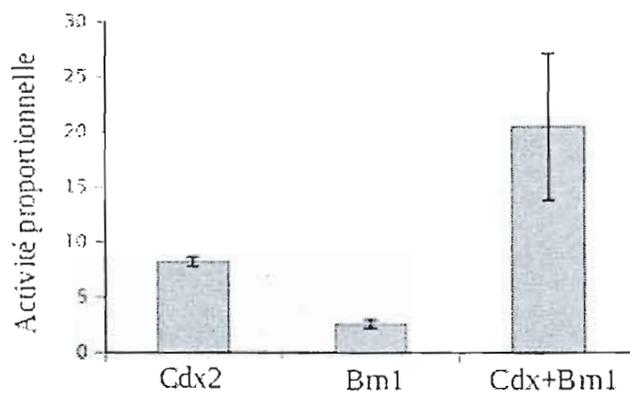


(B)

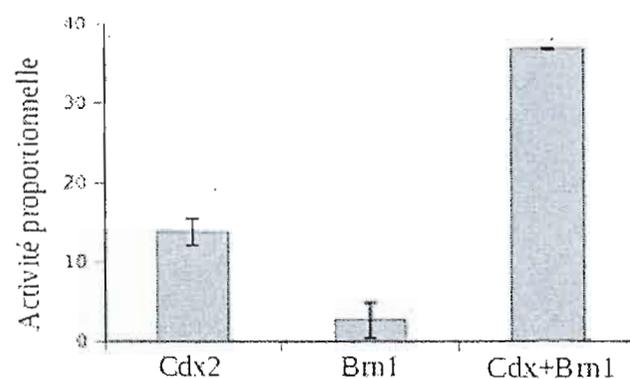


**Figure 3.10: Synergie entre les facteurs de transcription Cdx2 et Brn1 sur la région NCE2 de *Pax3*.** L'activité de la région NCE2 de *Pax3* mesurée par essai Luciférase 48 h après la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1. (A) 1.25 ng de chacun des plasmides sont transfectés dans les cellules Neuro2a. (B) 2.5 ng de chacun des plasmides sont transfectés dans les cellules Neuro2a. (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.

(A)



(B)



**Figure 3.11: Synergie entre les facteurs de transcription Cdx et Brn1 malgré la mutation du site de liaison pour Brn1 sur la région NCE2 de *Pax3*.** L'activité de la région NCE2 de *Pax3* mesurée par essai Luciférase 48 h après la transfection des cellules Neuro2a avec les plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1. (A) 1.25 ng de chacun des plasmides sont transfectés dans les cellules Neuro2a. (B) 2.5 ng de chacun des plasmides sont transfectés dans les cellules Neuro2a (n=3 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Depuis plusieurs années les recherches sur la neurulation ont focalisé sur l'étude des voies de signalisation et la régulation de gènes impliqués. La régulation du gène *Pax3* par la voie Wnt n'a pas été connue. Les études précédentes ont montré la régulation des gènes *Cdx* par les protéines Wnt.

Des études précédentes similaires à notre étude ont montré que le gène *Gbx2*, une cible directe de la voie de signalisation Wnt, est un des premiers facteurs de l'induction de la crête neurale et l'expression du gène *Pax3* est régulée indirectement par la protéine Gbx2 qui est un répresseur (Li et al., 2009). La fonction de *Gbx2* sur l'induction de la crête neurale est toutefois antérieure c'est-à-dire au niveau du cerveau, alors que celle des *Cdx* est postérieure c'est-à-dire au niveau du tronc. Le gène *Pax3* est en effet aussi exprimé dans les cellules de la crête neurale antérieure (Monsoro-Burq et al., 2005).

Des études préliminaires réalisées par notre laboratoire ont montré la co-expression du gène *Pax3* avec les protéines *Cdx* dans l'embryon caudal ainsi que la co-expression des gènes *Cdx* et *Pax3* dans les cellules Neuro2a. De plus, dans le cadre de cette étude, la diminution de l'expression de *Pax3* dans le tube neural dorsal d'un embryon *Cdx1*<sup>-/-</sup> de 6 somites a été démontré (fig. 1.6).

Dans cette recherche, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de *Pax3* par les facteurs de transcription *Cdx*. La lignée cellulaire que nous avons choisie était Neuro2a qui est la dérivée des cellules de la crête neurale, étant donc proche au modèle embryonnaire. Le gène *Pax3* est exprimé dans les cellules Neuro2a. Nous avons démontré par essai Luciférase que le niveau d'expression de *Pax3* augmente en présence des protéines *Cdx* (*Cdx1*, 2 et 4) et diminue avec le dominant négatif Flag-EnRCdx1. De plus, nous avons démontré que

la transfection du plasmide d'expression de Flag-EnR ne change pas le niveau d'expression de *Pax3*.

#### **4.1 Régulation endogène de *Pax3* par les protéines Cdx et le dominant négatif EnRCdx1**

##### **4.1.1 L'induction de l'expression endogène de *Pax3* par les Cdx**

Nos résultats obtenus par RT-PCR montrent l'induction de l'expression endogène du gène *Pax3* par les facteurs de transcription Cdx dans les cellules Neuro2a (fig. 3.3). Par ailleurs, une RT-PCR sur les mêmes cellules a montré la présence des Cdx (fig. 1.7). Puisque les cellules Neuro2a sont les dérivées des cellules de la crête neurale, ces résultats suggèrent que l'expression de *Pax3* peut être aussi induite par les Cdx dans les cellules de la crête neurale *in vivo*.

##### **4.1.2 La diminution de l'expression endogène de *Pax3* par Flag-EnRCdx1**

Notre étude par RT-PCR a aussi montré la diminution de l'expression endogène de *Pax3* par le dominant négatif Flag-EnRCdx1 (fig. 3.3). Pourtant ce résultat ne montre pas la spécificité de l'effet répresseur du dominant négatif Flag-EnRCdx1. Pour montrer cela, *Gapdh* a été utilisé comme contrôle afin de montrer la spécificité de EnRCdx1. De plus, nous avons étudié l'effet du dominant négatif Flag-EnRCdx1 sur l'activité des promoteurs *Galectine1* et *Syncytine2* (fig. 6.1). Cette étude a montré que ce dominant négatif ne diminue pas l'activité de ces deux promoteurs qui ne sont pas des cibles Cdx (résultats supplémentaires). Par ailleurs, on attend que les protéines de fusion EnRCdx2 et EnRCdx4 diminuent aussi l'expression de *Pax3* car les domaines de liaisons à l'ADN des Cdx montrent une similarité structurale entre elles. Notre étude a montré que ce dominant négatif ne diminue pas l'expression de *Gapdh* dans les cellules Neuro2a. De plus, Flag-EnR n'a pas diminué l'expression de *Pax3* dans les cellules Neuro2a (fig. 3.3A).

#### **4.2 L'augmentation et la diminution de l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase en présence des protéines Cdx ou de Flag-EnRCdx1 en fonction de la concentration**

Selon l'étude que nous avons faite sur l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase dans les cellules Neuro2a, la présence des Cdx augmente l'expression de Pax3p1.6kb-Luciférase d'une façon en fonction de la concentration (fig. 3.5). Ce résultat suggère l'effet spécifique des Cdx sur l'activité du promoteur proximal de *Pax3*.

Les dominants négatifs ayant le rôle de répresseur sur l'activité des différents promoteurs sont largement utilisés. Des études précédentes ont montré le rôle des dominants négatifs EnRMeox1 et EnRSox15 dans la diminution de l'expression de *Pax3* dans les cellules différenciées P19 (Petropoulos et al., 2004; Savage et al., 2009). Une autre étude du dominant négatif EnRMef2c a montré l'effet de répression de l'expression de *Mef2c* par ce dominant négatif chez les cardiomyoblastes (Karamboulas et al., 2006). Ces auteurs ont aussi démontré que ce dominant négatif diminue l'expression des gènes cibles y compris *GATA4* et *BMP4*. De plus, l'expression d'un dominant négatif EnRNkx inhibe la cardiomyogénèse induite par Me(2)SO dans les cellules P19, mais pas la myogénèse skeletal. L'effet de EnRNkx sur l'inhibition de l'expression des marqueurs de cardiomyoblastes comme *GATA-4* et *MEF2C* est spécifique car les marqueurs de mésoderme comme *Brachyury T* et *Wnt5b* ne sont pas inhibés par ce dominant négatif.

#### **4.3 Fragmentation du promoteur proximal de Pax3 au niveau des sites de liaison pour les protéines Cdx**

Notre étude sur les différents fragments du promoteur proximal de *Pax3* nous a montré une forte activité pour les Cdx dans les deux régions NCE1 et NCE2 en réponse à Cdx2. De plus, la présence de la région de ce promoteur entre le NCE et le promoteur minimal ne change pas l'activité du promoteur proximal de *Pax3*. Par ailleurs, nous n'avons pas observé une forte activité dans le promoteur minimal en réponse à Cdx2, malgré la présence d'un site potentiel de liaison pour les Cdx sur ce

promoteur (fig. 3.6). Le promoteur minimal a été utilisé car il contient le site d'initiation pour la transcription et donc sa présence est nécessaire pour l'expression de *Pax3* dans les cellules Neuro2a.

#### **4.4 Mutation des sites de liaison pour les Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3***

Notre étude de mutation des sites de liaison pour les Cdx dans la région NCE du promoteur proximal de *Pax3* n'a pas montré la diminution d'induction de *Pax3* par les Cdx, ce qui pourra être expliqué par la présence d'autres facteurs de transcription sur ce promoteur qui peuvent interagir avec les Cdx.

Une étude a révélé précédemment la présence de deux sites de liaison pour les facteurs de transcription POU classe III sur le promoteur proximal de *Pax3* (Pruitt et al., 2004). Notre étude sur les niveaux de l'expression de *Pax3* par les Cdx dans les cellules Neuro2a par l'essai Luciférase a démontré que l'induction de *Pax3* par la protéine Cdx2 était plus forte que celle par Cdx1 ou Cdx4 (fig. 3.5). Donc, on s'est intéressé à étudier l'interaction entre les protéines Cdx2 et un des facteurs de la famille Pou classe III, Brn1, sur le promoteur proximal de *Pax3*.

#### **4.5 Régulation des co-facteurs potentiels des Cdx dans les cellules Neuro2a et P19**

Afin de vérifier la présence des co-facteurs pour les Cdx dans la régulation de *Pax3*, on a procédé à l'étude par RT-PCR. Cette étude a démontré la présence de plusieurs transcrits dans les cellules Neuro2a qui sont absents dans les cellules P19. Sox2 et les facteurs de famille Pou classe III y compris Brn1, Brn2, Brn4 sont présents dans les cellules Neuro2a (fig. 3.9), mais seul Sox2 est présent dans les cellules P19 (résultats non montrés). On peut conclure par ces résultats que les co-facteurs Brn1, Brn2 et Brn4 peuvent interagir avec les protéines Cdx afin de réguler l'expression de *Pax3* dans les cellules Neuro2a, mais puisque Sox2 n'est pas un

facteur propre aux cellules Neuro2a et il est aussi présent dans les cellules P19, il est exclu de notre étude.

#### **4.6 Synergie entre les protéines Cdx et Brn1 sur le promoteur proximal de *Pax3***

Nous avons démontré une synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1 sur le promoteur proximal de *Pax3*. Les résultats obtenus par l'essai Luciférase suggèrent que cette synergie est plus forte pour les doses 1.25 ng de chacune de ces protéines par rapport aux doses 2.5 ng pour ces mêmes plasmides. Cependant, la mutation du site de liaison pour Brn1 ne diminue pas cette synergie. Ces résultats peuvent suggérer que d'autres facteurs de transcription sur le promoteur de *Pax3* prennent la relève de Brn1 pour la synergie avec Cdx2. En plus, l'apparition de la synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1 malgré la mutation du site de Brn1 pourrait s'expliquer par la présence d'autres co-facteurs pour Cdx2 y compris Zic2 (I. Tremblay, résultats non publiés) qui forme un plus grand complexe avec Cdx2 et Brn1. La perte de synergie entre les co-facteurs Cdx2 et Brn1 pour les doses des plasmides d'expression de Cdx2 et Brn1 supérieures à 5 ng nous permet de conclure que l'effet synergique entre les co-facteurs sur le promoteur proximal de *Pax3* est en fonction de la concentration. Donc, le fait que la synergie entre les facteurs de transcription Cdx2 et Brn1 est en fonction de la concentration signifie que la présence de plus d'une quantité précise de ces protéines peut bloquer cette synergie sur le promoteur proximal de *Pax3*.

#### **4.7 Mutation du site de liaison pour Brn1 sur le promoteur proximal de *Pax3***

Notre étude a montré un effet synergique entre les protéines Brn1 et Cdx2 sur le promoteur proximal de *Pax3*. Pourtant, la mutation du site de liaison pour Brn1 sur ce promoteur a augmenté cette synergie.

Un effet semblable à celui-ci a été observé pour d'autres facteurs de transcription sur d'autres promoteurs. Selon une étude par Girard et Goosens, la mutation de site de liaison pour Sox10 sur les promoteurs de *GJB1* et *MITF* augmente

l'effet synergique de Sox10 avec ses co-facteurs EGR2 et Pax3 (Girard et Goosens, 2006).

Une étude a montré que le site potentiel de liaison pour Brn1 se trouve dans la région de NCE2 sur le promoteur proximal de *Pax3* (Pruitt et al., 2004). Dans la mesure où la mutation du site de Brn1 n'a pas diminué la synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1, il se pourrait que la mutation de 3 bases nucléiques du site consensus de Brn1 sur 8 bases nucléiques n'est pas suffisante. On pourra utiliser la technique de EMSA afin de confirmer le blocage de l'attachement de Brn1 à son site muté. Si la mutation du site de liaison pour Brn1 n'empêche pas la liaison à l'ADN, il faudra muter toutes les bases nucléiques du site consensus de Brn1. Par contre, si la mutation du site de liaison pour Brn1 empêche la liaison à l'ADN, on peut émettre l'hypothèse que le site de liaison pour Brn1 pour amener les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3* n'est pas absolument nécessaire.

De l'ensemble des résultats de notre recherche, on conclut que les sites potentiels de liaison pour les protéines Cdx n'existent pas sur le promoteur proximal de *Pax3* mais que ces protéines peuvent s'attacher sur ce promoteur à travers les sites de liaison pour d'autres protéines.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Ce travail de recherche a été consacré à l'étude de la régulation de l'expression du gène *Pax3* par les facteurs de transcription Cdx ainsi que sa répression par le dominant négatif EnRCdx1. Notre étude sur la régulation de l'expression de *Pax3* endogène par RT-PCR a montré que les protéines Cdx induisent l'expression du gène *Pax3*, alors que le dominant négatif EnRCdx1 la réprime. Donc, l'expression endogène de *Pax3* est régulée par les facteurs de transcription Cdx. Le deuxième objectif de cette recherche consistait à déterminer la fonctionnalité des sites potentiels pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3*. On a procédé à une étude de l'activité de ce promoteur en présence des protéines Cdx par une délétion de ce promoteur. On a montré que l'activité du promoteur proximal de *Pax3* est plus forte dans les deux régions de NCE1 et NCE2. Afin de vérifier la fonctionnalité des sites de liaison pour les protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3*, les mutations de ces sites en combinaison ont été effectuées. L'induction de *Pax3* par les protéines Cdx malgré ces mutations suggère très fortement que les sites de liaison pour les protéines Cdx n'existent pas sur le promoteur proximal de *Pax3* mais que les protéines Cdx peuvent former des complexes avec d'autres facteurs de transcription sur ce promoteur. La présence des protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3* a été montré par ChIP (N. Pilon, fig. 1.8). On a montré la présence des transcrits de Brn1, Brn2, Brn4 et Sox2 dans les cellules Neuro2a par RT-PCR. Notre recherche sur les partenaires des protéines Cdx sur le promoteur proximal de *Pax3* a montré la synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1. On a observé une forte synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1 pour la dose de 1.25 ng de chacun de leur plasmides d'expression. Pourtant, la mutation du site de Brn1 sur le promoteur proximal de

*Pax3* n'a pas diminué la synergie entre les protéines Cdx2 et Brn1.

- Par ailleurs, en essai Luciférase une synergie entre Cdx2 et Zic2 a été observée dans les cellules Neuro2a (résultats préliminaires de notre laboratoire). Il sera intéressant de montrer l'interaction entre les protéines Cdx1/2/4 et Zic2 par l'immunoprécipitation.

- Puisque les transcrits de Brn2 et Brn4 ont aussi été observés par RT-PCR dans les cellules Neuro2a (fig. 3.9), une étude sur la synergie entre les protéines Cdx avec la protéine Brn2 ainsi qu'avec la protéine Brn4 sera intéressante.

- Puisque Tead2 est un facteur de transcription qui régule l'expression de *Pax3* et son site de liaison se trouve sur le promoteur proximal de *pax3*, on pourra aussi étudier la synergie entre les protéines Cdx et Tead2 par l'essai Luciférase.

- Aussi il sera intéressant de montrer l'interaction entre les protéines Cdx1/2/4 avec Brn1/Brn2/Brn4/Tead2 par l'immunoprécipitation.

- En complément de l'expérience par RT-PCR, le western blot sur les lysats de cellules Neuro2a marquées avec GFP pourra montrer si les protéines Cdx ont une activité de modulation de protéine de Pax3. Puisque les cellules Neuro2a exprime peu de protéines Cdx et que le niveau basal de l'expression de Pax3 peut masquer les résultats, il faudra trier les cellules Neuro2a marquées des cellules non marquées après les avoir incubé pendant 48 h avec les plasmides d'expression des Cdx ou du dominant négatif.

- Précédemment, une étude a révélé que les enhanceurs de NCE dans le promoteur proximal de *Pax3* sont suffisants pour récapituler le patron d'expression de *Pax3* dans la crête neurale (Li et al., 1999; Milewski et al., 2004). Cependant, il a été

montré que ces enhancers du promoteur proximal de *Pax3* ne sont pas nécessaires pour l'induction de la crête neurale, puisqu'un autre enhancer dans l'intron 4 de *Pax3* prend leur relève dans le développement de la crête neurale (Degenhardt et al., 2010). Il a été montré que ces éléments d'enhancer ont la redondance fonctionnelle pour la régulation de l'expression de *Pax3* au niveau de la crête neurale et du tube neural dorsal. Ils ont aussi montré l'existence de sites potentiels de liaison pour la protéine Lef1 sur la région conservée du locus de *Pax3* dans son intron 4 (ECR2). Pourtant, une étude récente sur la transactivation de ECR2-Luc par les Cdx montre que Lef1+ $\beta$ -caténine ne régule pas l'expression de *Pax3* au niveau de ECR2, alors que Cdx2 cause une induction de son expression (résultats préliminaires de notre laboratoire). Ainsi, une étude similaire à l'étude que nous avons faite sur la fonctionnalité des sites potentiels des Cdx sur la région NCE2 du promoteur proximal de *Pax3* pourra être éventuellement réalisée sur la région ECR2 de *Pax3*. Les protéines Cdx peuvent occuper ECR2 de *Pax3* soit directement soit en se liant aux autres facteurs de transcription y compris Brn1. Donc, l'activité de *Pax3* au niveau de ECR2 peut être déterminée en faisant diverses mutations au niveau des sites de liaison de ces co-facteurs.

- Enfin, l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) sur les cellules Neuro2a a montré que les protéines Cdx peuvent occuper les régions NCE de *Pax3* endogène (fig. 1.8). Il sera intéressant de déterminer la présence physique des protéines Cdx sur la région ECR2 de *Pax3*. Parallèlement à notre étude *in vitro*, une étude *in vivo* sur la régulation de *Pax3* par les protéines Cdx sera intéressante. On pourra démontrer par ChIP l'occupation de NCE et ECR2 de *Pax3* par les protéines Cdx dans les embryons e8.5 de souris.

- Par ailleurs, une étude *ex vivo* sur la régulation de l'expression de *Pax3* par les protéines Cdx sera intéressante à faire. Les explants de la crête neurale pourront

être un bon modèle à utiliser pour cette étude. On pourra éventuellement étudier l'effet du dominant négatif EnRCdx1 sur l'expression de *Pax3* dans ces explants.

## CHAPITRE VI

### RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

#### 6.1 Effet spécifique du dominant négatif EnRCdx1

La figure 6.1 montre l'effet du dominant négatif EnCdx1 sur l'activité des deux promoteurs (A) *Galectine1* et (B) *Syncytine2*. Afin de vérifier si l'effet du dominant négatif EnRCdx1 au niveau de la réduction de l'expression du gène *Pax3* sur le promoteur de ce gène était spécifique, son effet sur ces deux promoteurs a été étudié. Cette étude a montré que EnRCdx1 ne diminue pas l'activité des promoteurs *Galectine1* et *Syncytine2*.

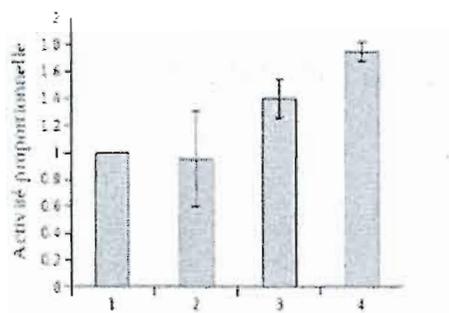
#### 6.2. Analyse des protéines Pax3 et Gapdh extraites des cellules Cos7

L'analyse des protéines extraites des cellules Cos7 qui étaient transfectées avec les plasmides d'expression de Gapdh et Pax3 a été faite par immunobuvardage 48 h après les transfections afin de vérifier si les anticorps  $\alpha$ -Gapdh et  $\alpha$ -Pax3 fonctionnent bien.

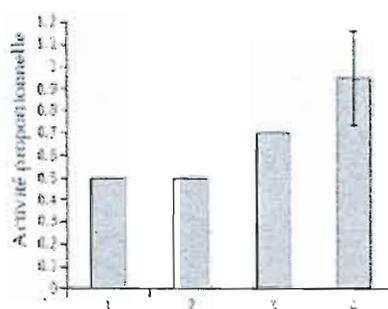
##### 6.2.1 Conditions optimales pour analyser la protéine Pax3

Le tableau I révèle les conditions optimales des expériences y compris les dilutions des anticorps et les milieux d'incubation des différentes protéines. Le TBS-T était le meilleur milieu pour l'incubation de toutes les protéines, sauf Pax3 et Cdx4 pour lesquelles le lait spécial a donné des meilleurs résultats.

(A)

Galectine1 

(B)

EnRCdx1 Syncytine2 EnRCdx1 

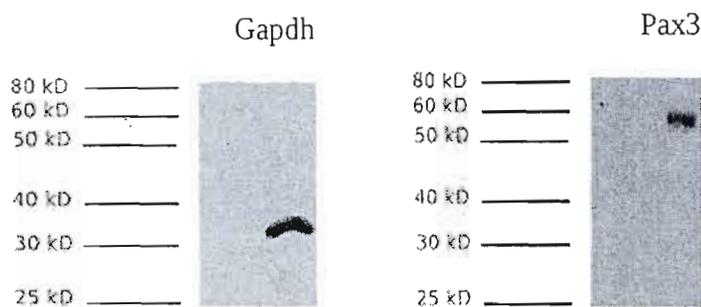
**Figure 6.1: Études de spécificité du dominant négatif EnRCdx1.** Notez l'augmentation de l'activité des promoteurs A) Galectine1 et B) Syncytine2 malgré la présence du dominant négatif EnRCdx1. Les doses transfectées du dominant négatif EnRCdx1 sont 1) 10 ng, 2) 20 ng et 3) 40 ng respectivement (n=2 pour les échantillons). Les valeurs ont été normalisées pour la quantité de protéines totales.

**Tableau I**  
**Étude de concentration d'anticorps**

protéine	dilution d'anticorps	milieu d'incubation
Flag-EnR	1/1000	TBS-T
Flag-EnRCdx1	1/1000	TBS-T
Pax3	1/500	lait spécial
Gapdh	1/2500	TBS-T
Cdx1	1/1000	TBS-T
Cdx2	1/1000	TBS-T
Cdx4	1/500	lait spécial

### 6.2.2 Résultats d'immunobuvardage des cellules Cos7

Les protéines Cdx1, Cdx2, Cdx4, Pax3, Gapdh, EnR et EnRCdx1 des extraits des protéines totales des cellules Cos7 ont été analysées par immunobuvardage (fig. 6.2).



**Figure 6.2: Expression des protéines Gapdh et Pax3 dans les cellules Cos7 mesurée par Western blot.** Les échantillons d'extraits protéiques des cellules Cos7 non transfectées sont les contrôles représentés à gauche de chaque échantillon dans l'image des gels (n=1).

## BIBLIOGRAPHIE

- Altmann, C. R. & Brivanlou, A. H. 2001. Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* 203: 447-482.
- Bang, A. G., Papalopulu, N., Goulding, M. D. & Kintner, C. 1999. Expression of Pax3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Dev Biol* 212: 336-380.
- Barrow, J. J., Stadler, H. S., Capecchi, M. R., 2000. Roles of Hoxa1 and Hoxa2 in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* 127(5): 933-944.
- Basch, M. L., Bonner-Fraser, M. & Garcia-Castro, M. I. 2006. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires Pax7. *Nature* 441: 218-222.
- 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.
- Béland, M. et al. 2004. Cdx autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol Cell Biol* 24: 5028-5038.
- Bell, E., Wingate, R.J., Lumsden, A. 1999. Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science* 284(5423): 2168-2171.
- Blumberg, B., Bolado, J., Morena, T. A., Kintner, C., Evans, R. M. & Papalopulu, N. 1997. An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* 124: 373 -379.
- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., Caignec, C. L., Wegner, M. & Goossens, M. 2000. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet* 9: 1907 -1917.
- Burns, A. J. & LeDouarin, N. M. 1998. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125: 4335-4347.
- Carlson, B. 2004. *Human embryology and developmental biology*. Mosby. USA.
- Charité, J. et al. 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of Cdx gene products with position-sensitive regulatory elements.

Development 125: 4349-4358.

Conway, S. J., Henderson, D. J., Kirby, M. L., Anderson, R. H. & Copp, A. J. 1997. Development of a lethal congenital heart defect in the splotch (Pax3) mutant mouse. *Cardiovasc Res* 36(2): 163-173.

Davenne, M., Maconochie, M. K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R., Rijli, F.M. 1999. *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* 22: 677-691.

Degenhardt, K. R., Milewski, R. C., Padmanabhan, A., Miller, M., Singh, M. K., Lang, D., Engleka, K. A., Wu, M., Li, Z., Zhou, D., Antonucci, N. Li, L. & Epstein, J. A. 2010. Distinct enhancers at the *Pax3* locus can function redundantly to regulate neural tube and neural crest expressions. *Dev Biol* 339(2): 519-527.

Deschamps, J. & van Nes, J. 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132: 2931-2942.

Eisenmann, D. M. 2005. Wnt signaling. *WormBook*. 25: 1-17.

Gamer, L. W. & Wright, C. V. 1993. Murine *Cdx4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43: 71-81.

Gamse, J. & Sive, H. 2000. Vertebrate anteroposterior patterning: the *Xenopus* neuroectoderm as a paradigm. *Bioessays* 22(11): 976-986.

Garcia-Martinez, V., Alvarez, I. S., Schoenwolf & G. C. 1993. Locations of ectodermal and neuroectodermal subdivisions of the epiblast at stages 3 and 4 of avian gastrulation and neurulation. *J Exp Zool* 267(4): 431-446.

Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. & Rijli, F. M. 1997. Role of *Hoxa-2* in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* 124: 3693-3702.

Gilbert, S. F. 2006. *Developmental biology*. 8<sup>th</sup> edition. Sinauer Associates Inc.

Girard, M. & Goosens, M. 2006. Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Letters* 580: 1635-1641.

Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. & Gruss, P. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*. 10: 1135 -1147.

- Goulding, M. D., Lumsden, A., & Gruss, P. 1993. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing signal cord. *Development* 117: 1001-1016.
- Hall, B. K. & Hörstadius, S. 1988. *The Neural Crest*. Oxford University Press, Oxford.
- He, X, Treacy, M. N., Simmons, D. M., Ingraham, H. A., Swanson, L. W. & Rosenfield, M. G. 1989. Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain developmetn. *Nature* 340: 35-41.
- Holland, P, Ingham, T. & Krauss, S. 1992. Mice and flies head to head. *Nature* 358: 627-628.
- Hombria, J. C. & Lovegrove, B. 2003. Beyond homeosis-HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 71: 461-476.
- Hong, C. S., Park, B. Y. & Saint-Jeannet, J. P. 2008. Fgf8a induces neural crest indirectly through the activation of Wnt8 in the paraxial mesoderm. *Development* 135(23): 3903-3910.
- Ikeya, M. & Takada, S. 2001. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of cdx-1 expression. *Mech Dev* 103: 27-33.
- Jeffery, W. R., Strickler, A. G. & Yamamoto, Y. 2004. Migratory neural crest-like cells from body pigmentation in a urochordate embryo. *Nature* 431: 696-699.
- Karamboulas, C., Dakubo, G. D., Liu, J., De Repentigny, Y., Yutzey, K., Wallace, V. A., Kothary, R., Skerjanc, I. S. 2006. Disruption of MEF2 activity in cardiomyoblast inhibits cardiomyogenesis. *J Cell Sci* 119(Pt 20): 4315-4321.
- Katsuyama, Y., Sato, Y., Wada, S. & Saiga, H. 1999. Ascidian tail formation requires caudal function. *Dev Biol* 213: 257-268.
- Kirby, M. L. & Waldo, K. L. 1990. Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* 82: 332-340.
- Kirby, M. L., Gale, T. F., Stewart, D. E. 1983. Neural crest cells contribute to aorticopulmonary septation. *Science* 220: 1059-1061.
- Kirby, M. L. & Waldo, K. L. 1995. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res* 77(2): 211-215.

- Koblar, S. A., Murphy, M., Barrett, G. L., Underhill, A., Gros, P. & Barlett, P. F. 1999. Pax-3 regulates neurogenesis in neural crest-derived precursor cells. *J Neurosci Res* 56(5): 518-530.
- LaBonne, C. & Bronner-Fraser, M. 1998. Neural crest induction in *Xenopus*: evidence for a two-signal model. *Development* 125: 2403-2414.
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M. M. & Epstein, J. A. 2000. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* 106(8): 963-967.
- Lawson, K. A. & Pedersen, R. A. 1992. Clonal analysis of cell fate during gastrulation and early neurulation in the mouse. *Ciba Found Symp* 165: 3-21.
- Le Douarin, N. & Teillet, M. A. 1973. Studies on the determination of neural crest -cell migration. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci* 277(18): 1929-1932.
- Le Douarin, N. & Kalcheim, C. 1999. *The Neural Crest*. 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, New York.
- Lee, S. K. & Pfaff, S. L. 2001. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat Neurosci* 4, Suppl, 1183-1191.
- Le Lièvre, C. S. & Le Douarin, N. M. 1975. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 34: 125-154.
- Leon, T. Y. Y., Ngan, E. S. W., Poon, H. C., So, M. T., Liu, V. C. H., Tam, P. K. H. & Garcia-Barcelo, M. M. 2009. Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Spx10, and Pax3. *J Pediatric Surgery* 44: 1904-1912.
- Li, J., Liu, K. C., Jin, F., Lu, M. M. & Epstein, J. A. 1999. Transgenic rescue of congenital heart disease and spina bifida in *Spotch* mice. *Development* 126: 2495-2503.
- Li, B., Kuriyama, S., Moreno, M. & Mayor, R. 2009. The posteriorizing gene *Gbx2* is a direct target of Wnt signalling and the earliest factor in neural crest induction. *Development* 136: 3267-3278.
- Logan, C. Y. & Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Lohnes, D. 2003. The *Cdx1* homeodomain protein: an integrator of posterior

signaling in the mouse. *Bioessays* 25: 971-980.

Lumdsen, A. G. S. 1991. The development and significance of hind brain segmentation. *Semin Dev Biol* 1: 117-126.

Mancilla, A. & Mayor, R. 1996. Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of Xslug induction. *Dev Biol* 177(2): 580-589.

Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M. & Gruss, P. 1996. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice. *Development* 122: 831-838.

Marchant, L., Linker, C., Ruiz, P., Guerrero, I. & Mayer, N. 1998. The inductive properties of mesoderm suggest that the neural crest cells are specified by a BMP gradient. *Dev. Biol.* 198: 319-329.

Mayor, R., Murga, R. & Sargent, M. G. 1995. Induction of the prospective neural crest of *Xenopus*. *Development* 121: 767-777.

Mayor, R., Guerrero, I. & Martinez, C. 1997. Role of FGF and noggin in neural crest induction. *Dev Biol* 189: 1-12.

Meulemans, D. & Bronner-Fraser, M. 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental Cell* 7: 291-299.

Meyer, B. I. & Gruss, P. 1993. Mouse Cdx1 expression during gastrulation. *Development* 117: 191-203.

Milewski, R. C., Chi, N. C., Li, J., Brown, Ch., Lu, M. M. & Epstein, J. A. 2004. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* 131: 829-837.

Mita, K. & Fujiwara, S. 2007. Nodal regulates neural tube formation in the *Ciona intestinalis* embryo. *Dev Genes Evol* 217: 593-601.

Monsoro-Burq, A.H., Wang, E., & Harland, R. 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Dev Cell* 8: 167-178.

Moon, R. T., Bowerman, B., Boutros, M. & Perrimon, N. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through  $\beta$ -catenin. *Science* 296: 1644-1646.

Murashov, A. K., Pak, E. S., Hendricks, W. A., Owensby, J. P., Sierpinski, P. L., Tatko, L. M. & Fletcher, P. L. 2005. Directed differentiation of embryonic stem cells

into dorsal interneurons. *FASEB J* (2): 252-254.

Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. & Behringer, R. 2003. *Manipulating the mouse embryo*. 3<sup>rd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Natoli, T. A., Ellsworth, M. K., Wu, C., Gross, K. W., & Pruitt, S. C. 1997. Positive and negative DNA sequence elements are required to establish the pattern of Pax3 expression. *Development* 124: 617-626.

Nelms, B. L., Pfaltzgraff, E.R & Labosky, P. A. 2010. Functional interaction between Foxd3 and Pax3 in cardiac neural crest development. (to be published ). *Genesis*.

Nolte, C., Rastegar, M., Amores, A., Bouchard, M., Grote, D., Maas, R., Kovacs, E. N., Postlethwait, J., Rambaldi, I., Rowan, S., Yan, Y. L., Zhang, F. & Featherstone, M. 2006. Stereospecificity and PAX6 function direct Hoxd4 neural enhancer activity along the antero-posterior axis. *Dev Biol* 299(2): 582-593.

Nordeen, S. K. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6: 454-458.

Nordstorm, U., Maier, E., Jessell, T. M. & Edlund, T. 2006. An early rôle for Wnt signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PloS Biol* 4, 252.

Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Doi, H. & Eto, K. 1994. The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos. *Dev Biol*. 164(2): 409-419.

Panchision, D. M. & McKay, R. D. 2002. The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev* 12, 478-487.

Partanen, J. 2007. FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain. *J Neurochem* 101(5): 1185-1193.

Petropoulos II., Gianakopoulos P. J., Ridgeway A. G. et al. 2004. Disruption of Meox or Gli activity ablates skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem* 279: 23874-23881.

Pilon, N. et al. 2006. Cdx4 is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Dev Biol* 289: 55-63.

Pilon, N., Oh, K., Sylvestre, J. R., Savory, J. G. & Lohnes, D. 2007. Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo. *Development* 134: 2315-2323.

- Potterf, S. B., Furumura, M., Dunn, K. J., Arnheiter, H. & Pavan, W. J. 2000. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet* 107: 1-6.
- Pruitt, S. C., Bussman, A., Masslov, A.Y., Natoli, T. A. & Heinaman, R. 2004. Hox/Pbx and Brn binding site mediate Pax3 expression in vitro and in vivo. *Gene Expr Patterns* 4: 671-685.
- Pyrgaki, C., Trainor, P., Hadjantonakis, A. K. & Niswander, L. 2010. Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Dev Biol* 344(2): 941-947.
- Roelink, H. & Nusse, R. 1991. Expression of two members of the Wnt family during mouse development restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev* 5(3): 381-388.
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T. & Clevers, H. 1999. Synergy Between Tumor Suppressor APC and the  $\beta$ -Catenin-Tcf4 Target *Tcf1*. *Science* 285(5435): 1923-1926.
- Sadler, T. 1985. *Langman's medical embryology*, 5<sup>th</sup> ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins: 335.
- Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. 2008. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Review* 9: 557-568.
- Savage, J., Conley, A. J., Blais, A. & Skerjanc, I. 2009. Sox15 and Sox7 differentially regulate the myogenic program in P19 cells. *Stem Cells* 27: 1231-1243.
- Savory, J. G., Pilon, N., Grainger, S., Sylvestre, J. R., Béland, M., Houle, M., Oh, H. & Lohnes, D. 2009. Cdx1 and Cdx2 are functionally equivalent in vertebral patterning. *Dev Biol* 330(1): 114-122.
- Schnapp, E., Kragl, M., Rubin, L., Tanaka, E. M. 2005. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development* 132: 3243-3253.
- Schoenwolf, G. C. et Smith, J. L. 1990. Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* 109: 243-270.
- Sedberzija, G. N., Bronner-Fraser, M. & Fraser, S. E. 1990. Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labeling. *Development* 108: 605-612.

Sedberzija, G. N., Burgan, S., Fraser, S. E. & Bronner-Fraser, M. 1991. Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development*. 111(4): 857-866.

Sedberzija, G. N., Bronner-Fraser, M. & Fraser, S. E. 1992. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development* 116(2): 297-307.

Selleck, M. A. & Bronner-Fraser, M. 1996. The genesis of avian neural crest cells: a classic embryonic induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(18): 9352-9357.

Shiotsugu, J., Katsuyama, Y., Arima, K., Baxter, A., Koide, T., Song, J., Chandraratna, r. A. S. 2004. Multiple points of interaction between retinoic acid and FGF signaling during embryonic axis formation. *Development* 131: 2653-2667.

Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A. & Boncinelli, E. 1992. Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* 358: 687-690.

Thomas, A. J. & Erickson, C. A. 2009. FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development* 136: 1849-1858.

Tsuchida, T., Ensini, M., Morton, S. B., Baldassare, M., Edlung, T., Jessell, T. M. & Pfaff, S. L. 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79: 957-970.

van den Akker, E. et al. 2002. Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129: 2181-2193.

van Nes, J. et al. 2006. The Cdx4 mutation affects axial development and reveals an essential role of Cdx genes in the ontogenesis of the placental labyrinth in mice. *Development* 133: 419-428.

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

Wang, P., Liu, T., Li, Z., Ma, X. & Jin, T. 2006. Redundant and synergistic effect of Cdx-2 and Brn-4 on regulating proglucagon gene expression. *Endocrinology* 147(4): 1950-1958.

Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B. & Tachibana, M. 1998. Epistatic relationship

between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet* 18: 283 -286.

Wu, J., Yang, J. & Klein, P. S. 2005. Neural crest induction by the canonical Wnt pathway can be dissociated from anterior-posterior neural patterning in *Xenopus*. *Dev Biol* 279(1): 220-232.

Zhang, M., Kim, H. J., Marshall, H., Gendron-Maguire, M., Lucas, D. A., Baron, A., Gudas, L. J., Grindley, T., Krumlauf, R., Grippo, J. F. 1994. Ectopic *Hoxa-1* induces rhombomere transformation in mouse hindbrain. *Development* 120(9): 2431-2442.