

SÉBASTIEN TABARIÈS

**GÈNE *Hoxa5* : RÉGULATION ET MUTATION  
CONDITIONNELLE**

Thèse présentée  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire  
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

NOVEMBRE 2006

## Résumé

La fonction des gènes *Hox* est étroitement liée à leur expression durant le développement embryonnaire. Ainsi l'analyse de souris mutantes pour la fonction *Hoxa5* a révélé que ce gène joue un rôle crucial dans la spécification du squelette ainsi que dans l'ontogénie de plusieurs organes. Par transgénèse, nous avons défini des séquences régulatrices incriminées dans le contrôle de l'expression spatio-temporelle développementale du gène *Hoxa5*. Un fragment de 2.1 kb situé en aval du gène *Hoxa5* (nommé MES) possédant une activité "enhancer" dans les dérivés mésodermiques de la région cervicale avait précédemment été identifié. Par délétions successives de cette région, nous avons mis en évidence la présence de plusieurs éléments régulateurs. Parmi ces derniers, nous avons isolé deux séquences, les fragments AvEc-164 pb et PsHi-331 pb. Le fragment AvEc-164 pb apparaît essentiel au positionnement de la limite postérieure d'expression du gène *Hoxa5* au niveau de la dixième prévertèbre. Cette limite d'expression correspond à la limite postérieure de l'expression du transcrite fonctionnel de 1.8 kb du gène *Hoxa5*. Nous avons montré que la liaison spécifique de protéines Cdx et/ou Hox sur le fragment AvEc-164 pb était essentielle à son activité régulatrice. Contrairement au fragment AvEc-164 pb, le fragment PsHi-331 pb possède une activité "enhancer" et participe aux propriétés activatrices du MES. Des expériences de retard de migration (EMSA) montrent que des protéines présentes dans des extraits d'embryons de souris peuvent lier le fragment PsHi-331 pb. Les résultats de ces études sur la régulation du gène *Hoxa5* et leur impact sur la régionalisation de l'expression du gène seront présentés.

Enfin, dans le but de mieux appréhender les diverses fonctions du gène *Hoxa5* tout au long du développement, nous avons généré un mutant conditionnel par recombinaison homologue dans des cellules ES. Les phénotypes associés aux différents variants alléliques obtenus ont été caractérisés et comparés à ceux préalablement décrits chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>.



## Abstract

*Hox* gene functions are intimately linked to their correct developmental expression. The study of *Hoxa5* mutants revealed that this gene plays a crucial role in axial patterning and in organogenesis. Using transgenic mice, we identified several regulatory elements that govern *Hoxa5* gene expression. Among them, a 2.1 kb mesodermal enhancer sequence (MES) located downstream of *Hoxa5* coding sequences targets transgene expression in mesodermal derivatives at the cervico-upper thoracic level. Using a deletion analysis, we have showed that the MES contains several regulatory sequences. Among them, two sequences, the AvEc-164 bp and PsHi-331 bp fragments, were characterized. The AvEc-164 bp fragment is necessary for the correct positioning of the posterior boundary of *Hoxa5* expression domain at the level of prevertebra 10. This boundary corresponds to that of the *Hoxa5* 1.8 kb functional transcript. *Cdx* and/or *Hox* gene products interact specifically with the AvEc-164 bp fragment via two *caudal* consensus binding sites to restrict the *Hoxa5* gene expression domain. In contrast to the AvEc-164 bp fragment, the PsHi-331 bp DNA fragment possesses enhancer properties and likely contributes to MES activity. EMSAs experiments revealed that embryonic proteins bind to the PsHi-331 bp fragment. The results of these studies on the control of *Hoxa5* gene transcription and their impact on regional patterning will be presented.

In order to study the *Hoxa5* gene function and its role throughout development, we have generated a conditional null allele for the *Hoxa5* gene. The phenotypes associated to the various allelic variants produced by the targeting strategy were characterized and compared to the previously described *Hoxa5*<sup>-/-</sup> phenotypes.

## Avant-Propos

Le travail qui a fait l'objet de cette thèse a été réalisé au sein du Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval CHUQ-Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec dans le laboratoire de génétique développementale des mammifères dirigé par le Dr. Lucie Jeannotte.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie très sincèrement le Dr. Lucie Jeannotte pour avoir cru en moi et m'avoir offert l'opportunité de faire ce doctorat dans son laboratoire. Grâce à son encadrement, j'ai beaucoup appris et évolué dans ma perception de la recherche. Scientifiquement, sa démarche et sa rigueur auront déteint sur moi (enfin, je l'espère !!!). Je la remercie encore pour sa disponibilité, sa motivation, son support, ses conseils et son aide pour la rédaction de cette thèse.

Pendant mon séjour au sein du laboratoire, j'ai côtoyé de nombreuses personnes dont certaines sont devenues très proches. Ainsi, je souhaite remercier :

Tous les membres des laboratoires des docteurs Jeannotte et Charron et plus particulièrement Margot Lemieux pour sa précieuse aide et sa disponibilité.

Marcelle Carter, « Madame transgénèse », pour son rôle majeur dans le projet régulation et le temps qu'elle y a consacré.

Jérôme Lapointe pour avoir initié la caractérisation du MES et m'avoir initié, avec Julie Moreau, à la vie québécoise.

Tous les étudiants et personnel de recherche qui m'ont supporté et enduré pendant ces années : Julie Moreau, Michèle LeBlanc, Ugo Déry, Louis-François Bélanger, Yan Coulombe, Christelle Prudhomme, Elizabeth Garin, Isabel Mandeville, Mélanie Lalancette-Hébert, Nancy Frénette, Mélanie Morneau, Josée Paradis, Félix-Antoine Bérubé-Simard et Josée Aubin pour ces précieux commentaires et son soutien moral lors de l'écriture de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Mathieu Gravel, Nizar Chétoui et Vickram Bissonauth pour leur amitié sans faille. Tous ont participé à rendre mon séjour au Québec des plus agréables aussi bien au travail qu'en dehors.

En terminant, je tiens à exprimer ma reconnaissance à ma famille, notamment mes parents et beaux-parents qui nous ont soutenus (mes enfants, ma femme et moi) dans cette entreprise malgré le fait que cela se traduise par un éloignement géographique pas toujours facile à vivre.

Enfin, rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien indéfectible de Carole, ma femme, qui n'a pas hésité à me suivre dans cette aventure malgré tout ce que cela impliquait.

Je souhaite dédier cette thèse à mes enfants Nathaniel et Amelyne pour tout l'amour qu'ils me donnent au quotidien ainsi qu'à ma femme qui devrait prochainement donner naissance à notre troisième enfant.

## Glossaire

AA	: acide aminé
ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
AP	: antéropostérieur
ARE	: élément d'autorégulation
ARNm	: ARN messenger
BSC	: Brachial Spinal Cord
C	: vertèbre cervicale
Ca	: vertèbre caudale
CCN	: cellule de la crête neurale
CDRE	: élément de réponse au Cdx
ChIP	: immunoprécipitation de la chromatine
E	: stade embryonnaire
EMSA	: essai de retard sur gel
GCR	: région de contrôle global
HT	: hétérozygote
ION	: noyau olivaire inférieur
Kb	: kilobase
L	: vertèbre lombaire
LPM	: mésoderme de la plaque latérale
MES	: Mesodermal Enhancer Sequence
miRNA	: micro ARN
nt	: nucléotide
pb	: paire de base
PS	: ligne primitive
PSM	: mésoderme présomitique
pv	: prévertèbre
r	: rhombomère
RA	: acide rétinoïque
RACE	: amplification rapide des extrémités des ADN complémentaires
RAR	: récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	: élément de réponse à l'acide rétinoïque
RXR	: récepteur des rétinoïdes X
s	: somite
S	: vertèbre sacrale
SNC	: système nerveux central
SP	: protéine de surfactant
T	: vertèbre thoracique
TALE	: Three Amino Acid Loop Extension
UTR	: UnTranslated Region

## Table des matières

Chapitre I : Introduction .....	1
1.1. Les gènes <i>Hox</i> : de la drosophile aux mammifères .....	3
1.1.1. Les gènes <i>Hox</i> de la drosophile .....	3
1.1.1.1. Les gènes de segmentation .....	5
1.1.1.2. Les gènes homéotiques sélecteurs .....	6
1.1.1.3. Etablissement des domaines d'expression des gènes homéotiques .....	7
1.1.1.4. Maintien des domaines d'expression des gènes homéotiques .....	9
1.1.1.5. Les protéines homéotiques.....	12
1.2. Les gènes <i>Hox</i> des vertébrés .....	13
1.2.1. Organisation génomique des complexes <i>Hox</i> des vertébrés .....	13
1.2.2. Régulation des gènes <i>Hox</i> des vertébrés.....	15
1.2.2.1. Régulation transcriptionnelle des gènes <i>Hox</i> .....	16
1.2.2.2. Génération de transcrits multiples à partir des locus des gènes <i>Hox</i> .....	41
1.2.2.3. Le principe de colinéarité .....	44
1.2.2.4. Les modifications post-traductionnelles des protéines Hox .....	47
1.3. Etude de la fonction des gènes <i>Hox</i> .....	48
1.3.1. Implication des gènes <i>Hox</i> dans la spécification du squelette axial .....	48
1.3.1.1. Les gènes <i>Hox</i> des groupes paralogues 1 à 4.....	49
1.3.1.2. Les gènes <i>Hox</i> des groupes paralogues 5 à 8.....	52
1.3.1.3. Les gènes <i>Hox</i> des groupes paralogues 9 à 13.....	55
1.3.2. Implication des gènes <i>Hox</i> dans les processus d'organogenèse .....	59
1.3.2.1. Gènes <i>Hox</i> et système nerveux central et crête neurale.....	59
1.3.2.2. Gènes <i>Hox</i> et morphogenèse des organes glandulaires .....	62
1.3.2.3. Gènes <i>Hox</i> et le système respiratoire.....	63
1.3.2.4. Gènes <i>Hox</i> et le système digestif .....	63
1.3.2.5. Gènes <i>Hox</i> et le système urogénital.....	64
1.3.2.6. Gènes <i>Hox</i> et la formation des membres .....	66
1.3.2.7. Gènes <i>Hox</i> et le développement post-natal.....	67
1.4. Ambiguïté de l'interprétation des phénotypes lors du maintien de la cassette de sélection .....	69

1.5. Notre modèle d'étude : le gène <i>Hoxa5</i> .....	71
1.5.1. Les séquences régulatrices qui gouvernent l'expression du gène <i>Hoxa5</i> .....	75
1.5.1.1. Un fragment génomique de 11.1 kb contient des éléments régulateurs pour l'expression spatio-temporelle du gène <i>Hoxa5</i> .....	75
1.5.1.2. L'élément BSC .....	77
1.5.1.3. L'élément MES .....	77
1.5.1.4. L'élément poumon/intestin .....	79
1.5.2. Etude de la fonction du gène <i>Hoxa5</i> .....	80
1.5.2.1. Les phénotypes au niveau du squelette axial et appendiculaire.....	81
1.5.2.2. Phénotype respiratoire des individus <i>Hoxa5</i> <sup>-/-</sup> .....	84
1.5.2.3. Phénotype digestif des mutants <i>Hoxa5</i> <sup>-/-</sup> .....	86
1.5.2.4. La perte de fonction du gène <i>Hoxa5</i> entraîne une hypothyroïdie.....	88
1.5.2.5. Phénotype de la glande mammaire des individus <i>Hoxa5</i> <sup>-/-</sup> .....	89
1.5.2.6. Autres phénotypes associés à la perte de fonction du gène <i>Hoxa5</i> .....	90
1.6. But des mes travaux de doctorat .....	92
Chapitre II .....	95
PRÉSENTATION .....	96
ABSTRACT .....	98
INTRODUCTION .....	99
MATERIALS AND METHODS.....	101
RESULTS .....	105
DISCUSSION .....	118
ACKNOWLEDGMENTS .....	122
REFERENCES .....	123
Chapitre III : .....	131
PRÉSENTATION.....	132
ABSTRACT.....	134
INTRODUCTION .....	135
MATERIALS AND METHODS.....	138
RESULTS .....	141
DISCUSSION.....	153

ACKNOWLEDGMENTS .....	157
REFERENCES .....	159
Chapitre IV : .....	167
PRÉSENTATION .....	168
ABSTRACT .....	170
INTRODUCTION .....	171
EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	174
RESULTS .....	177
DISCUSSION .....	185
ACKNOWLEDGMENTS .....	189
REFERENCES .....	190
Chapitre V : Discussion .....	194
5.1 La transcription associée au locus <i>Hoxa5</i> .....	195
5.1.1. Caractérisation des longs transcrits du gène <i>Hoxa5</i> .....	195
5.1.2. Le transcrit majeur du gène <i>Hoxa5</i> .....	199
5.2 Les séquences régulatrices qui gouvernent l'expression du gène <i>Hoxa5</i> .....	200
5.2.1. L'élément temporel .....	200
5.2.2. L'élément poumon/intestin .....	200
5.2.3. L'élément BSC .....	202
5.2.4. L'élément MES .....	204
5.2.4.1 Le fragment AvEc-164 pb .....	205
5.2.4.2 Le fragment PsHi-331 pb .....	211
5.2.4.3 L'action du MES est spécifique au promoteur proximal du gène <i>Hoxa5</i> .....	215
5.3. La mutation conditionnelle du gène <i>Hoxa5</i> .....	216
5.4. Conclusion .....	220
BIBLIOGRAPHIE .....	222

## Liste des tableaux

CHAPITRE I	
Tableau 1.1.....	83
CHAPITRE III	
Table 3.1.....	139
CHAPITRE IV	
Table 4.1.....	180
Table 4.2.....	184
CHAPITRE V	
Tableau 5.1.....	214



# Liste des figures

## CHAPITRE I

Figure 1.1.....	4
Figure 1.2.....	8
Figure 1.3.....	14
Figure 1.4.....	17
Figure 1.5.....	19
Figure 1.6.....	22
Figure 1.7.....	34
Figure 1.8.....	50
Figure 1.9.....	54
Figure 1.10.....	73
Figure 1.11.....	74
Figure 1.12.....	76
Figure 1.13.....	78
Figure 1.14.....	82

## CHAPITRE II

Figure 2.1.....	106
Figure 2.2.....	107
Figure 2.3.....	111
Figure 2.4.....	113
Figure 2.5.....	115
Figure 2.6.....	117

## CHAPITRE III

Figure 3.1.....	143
Figure 3.2.....	144
Figure 3.3.....	145
Figure 3.4.....	147
Figure 3.5.....	148
Figure 3.6.....	151
Figure 3.7.....	158

## CHAPITRE IV

Figure 4.1.....	178
Figure 4.2.....	182

## CHAPITRE V

Figure 5.1.....	196
Figure 5.2.....	197
Figure 5.3.....	201
Figure 5.4.....	203
Figure 5.5.....	212

Figure 5.6.....213

# Chapitre I : Introduction

Le développement d'un organisme multicellulaire, à partir d'un œuf fertilisé, est un processus complexe qui nécessite l'expression différentielle de l'information génétique selon un patron spatio-temporel précis. La compréhension des mécanismes moléculaires développementaux, nécessaires à l'obtention d'un organisme complexe, implique l'existence d'un contrôle hiérarchique comprenant des gènes régulateurs, qui régissent la cascade des événements génétiques, capables de moduler et diriger l'expression de gènes structuraux de façon à bien spécifier le devenir développemental des différentes régions de l'organisme. L'étude de la génétique développementale de la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, a permis de révéler l'importance de plusieurs classes de gènes indispensables au développement embryonnaire. Par la suite, la biologie développementale a pris son essor avec l'utilisation de mammifères comme modèle d'étude, notamment la souris. Associé à l'avènement de nouvelles techniques expérimentales, qui permettent l'étude spécifique de gènes en altérant leur expression, il a été possible d'identifier des gènes indispensables au développement des mammifères.

L'identification de familles de gènes essentiels a notamment été menée par des études d'homologie de séquences avec les gènes préalablement décrits chez la drosophile. Parmi ceux-ci, on retrouve les gènes *Hox* dont fait partie le gène *Hoxa5* qui est le modèle d'étude des travaux présentés dans cette thèse. Les facteurs de transcription codés par les membres de la famille des gènes *Hox* contrôlent les processus menant aux différences morphologiques observées le long de l'axe antéropostérieur (AP) chez tous les métazoaires. Ces gènes homologues à ceux du complexe HOM-C chez *Drosophila melanogaster* agissent sur des gènes cibles impliqués dans des événements morphogénétiques qui définissent l'identité régionale de l'embryon en développement. Il est maintenant clairement établi que les gènes *Hox* jouent un rôle primordial dans l'établissement du squelette axial, du squelette appendiculaire, ainsi que dans de nombreux processus d'organogenèse. Toutefois, beaucoup reste à découvrir sur les modes d'action et de régulation des gènes *Hox*. La compréhension de tels mécanismes moléculaires qui

contrôlent, via les gènes *Hox*, la bonne organisation et la topologie des structures, serait une avancée pour l'analyse du développement chez les mammifères. Ainsi, beaucoup d'études sont actuellement en cours pour définir la fonction exacte de chacun de ces gènes et les différents mécanismes de régulation qui contrôlent leur expression spatiale et temporelle. L'étude et la compréhension des cascades de signalisation, impliquant les gènes *Hox*, nécessitent l'identification des molécules régulatrices et des molécules cibles. De même, de nombreuses questions restent en suspens concernant la fonction post-natale des gènes *Hox*.

Dans le laboratoire, nous utilisons le gène *Hoxa5* comme modèle d'étude des gènes *Hox*. En effet, de par sa position centrale et son implication dans de nombreux processus d'organogenèse, ce gène est un modèle puissant. Trois axes de recherche majeurs sont étudiés dans le laboratoire, à savoir : la compréhension du rôle développemental du gène *Hoxa5*, l'élucidation du rôle postnatal du gène et finalement l'étude des mécanismes de régulation qui gouvernent son expression. D'une part, l'étude des rôles développementaux et postnataux est basée sur l'étude de souris mutantes pour la fonction du gène *Hoxa5* générée par le Dr Jeannotte (Jeannotte et al., 1991; Jeannotte et al., 1993). L'étude de ces souris a révélé de nombreux phénotypes au niveau du squelette axial, appendiculaire ainsi que dans différents processus d'organogenèse. D'autre part, une approche par transgénèse est utilisée pour l'identification des éléments régulateurs qui gouvernent l'expression spatio-temporelle du gène *Hoxa5* pendant le développement embryonnaire (Tuggle et al., 1990; Larochelle et al., 1999; Nowling et al., 1999; Moreau et Jeannotte, 2002). Ce dernier aspect constituera l'essentiel des travaux présentés dans cette thèse.

Dans ce chapitre d'introduction, une brève description de la découverte des gènes homéotiques chez la drosophile sera présentée. Par la suite, les connaissances actuelles concernant la régulation et la fonction des gènes *Hox* seront abordées. Ensuite, la régulation et la fonction spécifique du gène *Hoxa5*, notre modèle d'étude, seront détaillées. Enfin, les objectifs de mon projet de recherche au doctorat seront définis.

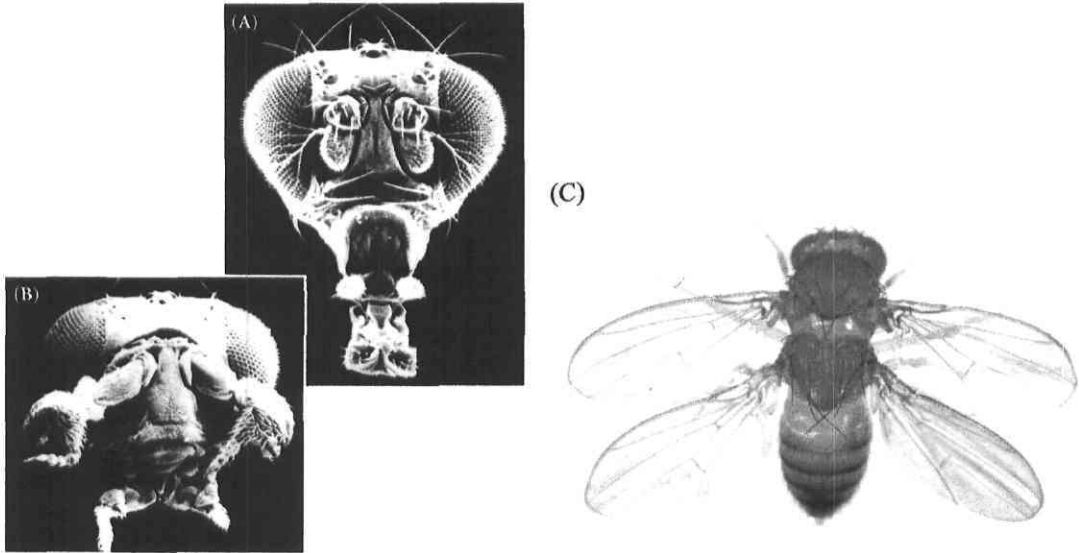
## 1.1. Les gènes *Hox* : de la drosophile aux mammifères

En 1894, le généticien William Bateson espérait étendre au règne animal les lois de l'hérédité de Mendel jugées jusqu'alors valables pour le seul règne végétal. Pour cela, il croisa des populations de drosophiles, dans l'espoir d'obtenir des individus mutants. Un jour, il trouva un cadavre de mouche présentant une paire de pattes en lieu et place des antennes. En fait, un gène, s'exprimant ordinairement dans le segment thoracique où sont localisées les pattes, s'était exprimé dans un autre segment, celui de la tête, mais avec le résultat habituel, soit l'apparition d'une paire de pattes (figure 1.1). Bateson décide de nommer « homéose » ce phénomène de changement d'identité des segments.

### 1.1.1. Les gènes *Hox* de la drosophile

Le plan corporel général de la drosophile est le même chez l'embryon, la larve et l'adulte. Il comprend une séquence d'unités segmentaires répétitives logées entre une tête et une queue. Trois de ces segments forment le thorax et huit autres l'abdomen. Chaque segment de la mouche adulte a son identité propre. Le premier segment thoracique, par exemple, présente des pattes, le second des ailes et des pattes et le troisième des pattes et des haltères.

La polarité antéropostérieure de l'embryon dérive des gènes à effet maternel qui produisent des ARN messagers (ARNm) distribués dans différentes régions de l'œuf. Ceux-ci codent pour des protéines qui contrôlent l'expression de certains gènes zygotiques. Parmi ces gènes à effet maternel, on retrouve les gènes *bicoid* et *hunchback* qui contrôlent la formation des structures antérieures de la tête et du thorax. Les gènes *nanos* et *caudal*, quant à eux, contrôlent la formation des segments abdominaux (Nusslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Les gènes zygotiques contrôlés par les facteurs maternels appartiennent à la famille des gènes de segmentation qui ont pour fonction de subdiviser l'embryon en unités répétitives : les segments.



### 1.1.1.1. Les gènes de segmentation

Les gènes de segmentation divisent l'embryon en 14 parasegments qui englobent la portion postérieure d'un segment et la partie antérieure du segment suivant (Martinez-Arias et Lawrence, 1985).

#### 1.1.1.1.1. Les gènes gap

Les gènes gap font passer l'embryon du stade caractérisé par les gradients de morphogènes, codés par les gènes à effet maternel, à un stade où l'embryon comporte des unités distinctes. Ils sont contrôlés par les gènes à effet maternel et divisent l'embryon en larges régions comportant plusieurs ébauches de parasegments. La mutation des gènes gap se traduit par un manque de segments contigus (Nusslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Il existe 9 gènes gap : *krüppel*, *knirps*, *hunchback*, *giant*, *tailless*, *huckebein*, *buttonhead*, *empty spiracles* et *orthodenticles*. Après l'établissement des domaines spécifiques aux différents gènes gap par les gènes à effet maternel, l'expression est stabilisée et maintenue par répression mutuelle entre les gènes gap (Jäckle et al., 1986; Harding et Levine, 1988).

#### 1.1.1.1.2. Les gènes de parité segmentaire ou « pair-rule »

Ces gènes sont contrôlés par les gènes gap pour diviser l'embryon en parasegments. En effet, une bande verticale de noyaux exprimant un gène pair-rule, est suivie par une autre bande de noyaux qui ne l'exprime pas, la bande suivante le ré-exprimant à nouveau. Ceci résulte en un embryon zébré le long de l'axe AP, ce qui divise l'embryon en sous-unités (Hafen et al., 1984). Les gènes pair-rule sont au nombre de 8 : *hairy*, *even-skipped*, *runt*, *fushi tarazu*, *paired*, *odd-paired*, *odd-skipped* et *sloppy-paired*. L'expression de chaque gène de parité segmentaire en 7 bandes divise l'embryon en quatorze parasegments. De plus, chaque parasegment exprime une combinaison particulière et unique de produits pair-rule qui activeront les gènes de polarité segmentaire.

### 1.1.1.1.3. Les gènes de polarité segmentaire

L'activité des gènes de polarité segmentaire se trouve à la frontière entre les processus de segmentation AP, contrôlés par les gènes pair-rule et les processus d'établissement de l'identité de chaque segment, contrôlés par les gènes sélecteurs. Des mutations dans ces gènes (*engrailed*, *wingless*, *cubitus interruptus*, *hedgehog*, *fused*, *armadillo*, *patched*, *gooseberry* et *pangolin*) entraînent des défauts dans le clivage des parasegments. Par exemple, la mutation du gène *gooseberry* (*gsb*) entraîne le remplacement de la partie postérieure d'un segment, où le gène est normalement exprimé, par la duplication de la partie antérieure du segment suivant (Pazdera et al., 1998). D'autre part, les gènes *engrailed* et *wingless* sont exprimés dans des cellules adjacentes, dans la partie postérieure de chaque segment, et leur expression est interdépendante. L'activation du gène *engrailed* se fait dans les trois rangées de cellules localisées dans la partie antérieure des segments et qui présentent un haut niveau de *even-skipped*, *fushi tarazu* ou *paired*. On retrouve ainsi l'expression du gène *engrailed* dans 14 bandes transversales qui marquent la limite antérieure de chaque parasegment (Bopp et al., 1986). Le gène *wingless* est contrôlé de façon inverse et en conséquence *wingless* est exprimé uniquement dans les rangées de cellules n'exprimant pas *engrailed* (Simmonds et al., 2001). Ces deux gènes activent la transcription de gènes comme *hedgehog* qui, en combinaison avec les produits d'autres gènes comme *naked* et *patched*, délimitent les parasegments (Lawrence et al., 1999b).

### 1.1.1.1.2. Les gènes homéotiques sélecteurs

Après l'établissement des limites segmentaires, les structures spécifiques à chaque segment se mettent en place. Cette spécification fait intervenir les gènes homéotiques (Lewis, 1978). Ils sont au nombre de huit chez la drosophile et groupés en deux complexes situés sur le chromosome 3. Le premier, le complexe Antennapedia, contient les gènes *labial* (*lab*), *antennapedia* (*Antp*), *sex comb reduced* (*Scr*), *deformed* (*Dfd*) et *proboscipedia* (*Pb*). Les gènes *labial* et *deformed* spécifient les segments céphaliques alors que *sex comb reduced* et *antennapedia* spécifient les segments thoraciques. Le gène *proboscipedia* ne semble avoir aucune fonction chez l'embryon mais son absence se traduit, chez l'adulte, par une transformation des structures labiales en pattes (Wakimoto et al., 1984; Kaufman et al., 1990). Le deuxième complexe, le complexe bithorax (Lewis,

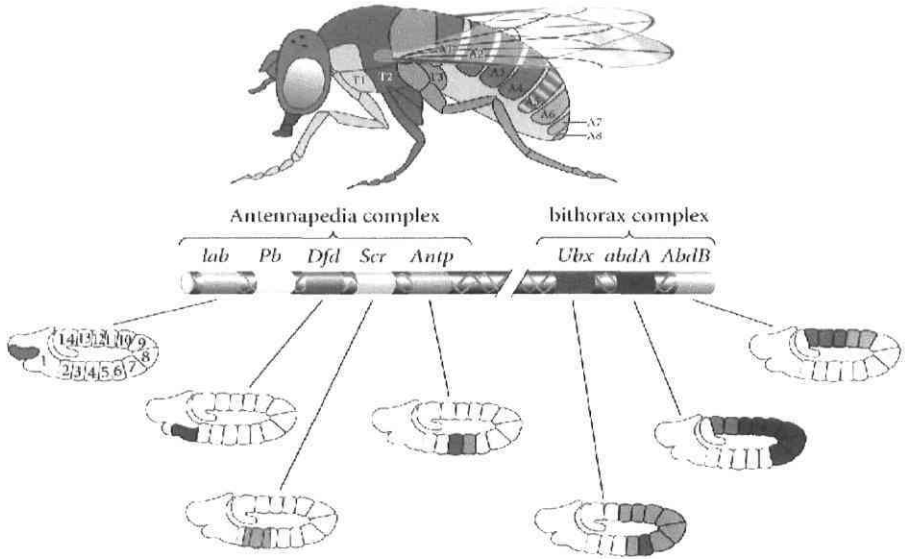


1978), contient les gènes *ultrabithorax* (*Ubx*), essentiel à l'identité du troisième segment thoracique, ainsi que les gènes *abdominal A* (*abdA*) et *abdominal B* (*AbdB*) responsables de l'identité des segments abdominaux (Sanchez-Herrero et al., 1985). La région chromosomique, qui englobe les deux complexes, est appelée le complexe homéotique (HOM-C). De façon intéressante, les gènes sont exprimés dans le même ordre selon l'axe AP que la façon dont ils sont ordonnés le long du chromosome (Lewis, 1978). Après ses premières études des gènes du complexe bithorax, E. Lewis, prix Nobel en 1995 pour ces travaux, avait conclu que les gènes homéotiques commandent le positionnement des cellules embryonnaires le long de l'axe AP de la mouche. Autrement dit, ils indiquent aux cellules qu'elles font partie de la tête, du thorax ou de l'abdomen.

La mutation des gènes homéotiques chez la mouche cause des phénotypes dits homéotiques, où les identités segmentaires spécifiques sont modifiées. Par exemple, une mutation dans les séquences régulatrices du gène *ultrabithorax* entraîne la transformation du troisième segment thoracique (normalement porteur d'haltères) en un deuxième second segment, normalement porteur d'ailes (Fernandes et al., 1994). Il en résulte une mouche à quatre ailes (figure 1.1) ; (Lewis, 1978). De la même façon, lorsque le gène *antennapedia* est exprimé dans la tête, les individus présentent des pattes à la place des antennes (figure 1.1) ; (Kaufman et al., 1990). Quand ce même gène n'est pas exprimé dans le second segment thoracique, des antennes poussent à la place des pattes (Struhl, 1981). La mutation du gène *sex comb reduced* a cela d'inhabituel qu'elle présente aussi bien une transformation de postériorisation des structures labiales en structures maxillaires, qu'une transformation d'antériorisation du segment thoracique T2 en T1 (Wakimoto et Kaufman, 1981; Struhl, 1983; Pattatucci et al., 1991; Pederson et al., 1996).

### 1.1.1.3. Etablissement des domaines d'expression des gènes homéotiques

Les domaines d'expression des gènes homéotiques ont été analysés, entre autres, par hybridation *in situ* et des transcrits de chaque gène ont été détectés dans des régions spécifiques de l'embryon (figure 1.2) ; (Harding et al., 1985; Akam, 1987). Ces domaines d'expression sont initialement définis par les gènes *gap* et de parité segmentaire qui



répriment l'expression d'un gène spécifiant une partie donnée du corps dans les régions où sa fonction n'est pas nécessaire. Ainsi, l'expression des gènes *abdA* et *AbdB* est réprimée dans la tête et le thorax par l'action des gènes *krüppel* et *hunchback* (Casares et Sanchez-Herrero, 1995). Le gène *antennapedia* est, quant à lui, activé par le gène *hunchback* dans le parasegment 4 qui spécifie le deuxième segment thoracique (Wu et al., 2001).

#### **1.1.1.4. Maintien des domaines d'expression des gènes homéotiques**

Bien que les gènes homéotiques soient exprimés dès les premiers stades de l'embryogenèse chez la mouche, leur fonction est requise pour maintenir l'identité des cellules durant tout le développement (Struhl, 1982). Le mécanisme impliqué pour la persistance de leur expression est cependant indépendant de leurs activateurs originaux. En effet, l'expression des gènes à effet maternel, des gènes *gap* et des gènes de parité segmentaire est transitoire. Une fois l'expression des gènes homéotiques initiée par les gènes de segmentation, les patrons d'expression sont maintenus par différents mécanismes.

##### **1.1.1.4.1. L'autorégulation**

De nombreux gènes homéotiques maintiennent leur domaine d'expression par un processus d'autorégulation. Pour exemple, la fonction du gène *Dfd* est requise pendant une grande partie du développement pour spécifier correctement le développement de la tête. Le maintien de son domaine d'expression se fait par un mécanisme d'autorégulation positive de la protéine Dfd sur sa propre unité transcriptionnelle (Kuziora et McGinnis, 1988). De la même façon, le produit du gène *Ubx* est capable de reconnaître des séquences régulatrices de son propre gène (Casanova et al., 1985; Casanova et al., 1987; Peifer et al., 1987). Enfin, le produit du gène *labial* aurait un effet d'autorégulation négative sur son propre promoteur (Chouinard et Kaufman, 1991).

##### **1.1.1.4.2. Régulation croisée entre les gènes homéotiques**

Un autre mécanisme de régulation permettant le maintien des domaines d'expression des différents gènes homéotiques fait intervenir une régulation croisée entre les différents produits des gènes homéotiques. Par exemple, le gène *Antp* est exprimé dans la région postérieure de l'embryon lorsque le gène *Ubx* est muté. Ainsi, le produit du gène

*Ubx* réprimerait l'expression du gène *Antp* dans la partie postérieure de l'embryon (Hafen et al., 1984). De même, le gène *Ubx* serait contrôlé par des gènes postérieurs tels que *abdB* et *AbdB* (Struhl et White, 1985; White et Wilcox, 1985). Dans certains cas, cette régulation croisée peut être dépendante du tissu. Ainsi, *Antp* régule négativement *Scr* dans l'épiderme et l'active dans le mésoderme viscéral (Reuter et Scott, 1990).

Autre fait intéressant, lorsque les gènes homéotiques sont exprimés de façon ectopique, ils induisent des changements phénotypiques mais seulement dans des parties antérieures à leur domaine normal d'expression (Mann et Hogness, 1990). Ainsi, l'expression du gène *Ubx* sous contrôle du promoteur du gène *hsp70* entraîne des transformations dans les segments céphaliques et thoraciques, régions antérieures au domaine d'expression habituel du gène *Ubx*, qui se retrouvent transformés en segment de type abdominal (A)1. Par contre, aucun effet au niveau du domaine normal d'expression du gène n'est observé, de même que dans les parties postérieures à ce domaine d'expression où le produit du gène *AbdB* empêche la protéine *Ubx* d'être active. Cette inactivation fonctionnelle a été appelée suppression phénotypique (Gonzalez-Reyes et Morata, 1990; Mann et Hogness, 1990). Autrement dit, la perte d'effet dans les régions postérieures ne peut s'expliquer que par une inactivation fonctionnelle de la protéine homéotique par les produits des gènes *Hox* résidents. Donc, si le gène suppresseur est absent, le produit dirigé par le promoteur d'expression ectopique est actif. De plus, lorsque l'expression de l'ensemble des gènes homéotiques est simultanément déréprimée par mutation du gène *extra sex comb (esc)*, un membre de la famille *Polycomb* (Section 1.1.1.3.3), le patron de segmentation résultant est dicté par le gène agissant le plus postérieurement (Duboule et Morata, 1994).

Chez la drosophile, les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de suppression phénotypique font intervenir des mécanismes de suppression transcriptionnelle et fonctionnelle des gènes homéotiques postérieurs sur les gènes homéotiques antérieurs (Bachiller et al., 1994; Duboule et Morata, 1994; Peichel et al., 1997). Par exemple, le spectre de spécificité de liaison à l'ADN de plusieurs gènes homéotiques se superpose. Il est possible que, dans les endroits où plusieurs protéines homéotiques sont coproduites, des sites d'autorégulation soient occupés et bloqués par le produit suppresseur. Ceci se

traduirait alors par une modulation de la transcription (Capovilla et Botas, 1998). Par exemple, l'expression du gène *decapentaplegic (dpp)* est contrôlée positivement par le produit du gène *Ubx* dans le parasegment 7 et négativement par le produit du gène *abdA* dans les parasegments 8 à 12. Cette régulation se fait par l'intermédiaire d'une séquence activatrice de 680 pb spécifique pour l'expression dans le mésoderme viscéral (Panganiban et al., 1990; Reuter et al., 1990). L'étude de cette séquence montre que lorsqu'un gène *Hox* agit comme répresseur de l'expression d'un gène, il prédomine sur ceux qui fonctionnent comme activateurs. Ainsi, le gène *abdA*, répresseur du gène *dpp*, domine sur le gène *Ubx* qui est un activateur du gène *dpp*. De ce fait, la suppression phénotypique impliquerait une dominance de la répression sur l'activation. Toutefois, la liaison des protéines *Ubx* et *abdA* ayant lieu sur des sites différents, il n'y aurait pas de compétition directe (Li et McGinnis, 1999). Enfin, les gènes postérieurs agiraient par répression des gènes cibles activés par les gènes homéotiques plus antérieurs. Cependant, ces gènes suppresseurs doivent aussi agir comme activateurs de certaines cibles et dans ce cas, on peut suggérer que la régulation croisée entre les gènes homéotiques (un gène postérieur réprimant les plus antérieurs) permettrait de s'assurer de la dominance des gènes homéotiques postérieurs (Capovilla and Botas, 1998).

#### 1.1.1.4.3. Régulation par les membres des familles *Polycomb* et *trithorax*

Enfin, il existe un autre mécanisme de régulation des domaines d'expression des gènes homéotiques qui fait intervenir les protéines des groupes *Polycomb (Pc)* et *Trithorax (Trx)*. Les embryons mutants pour les produits *Pc* meurent en présentant tous les segments transformés en segment abdominal A8 (Struhl, 1983). Chez le mutant du gène *Polycomb*, on retrouve une transformation du second segment thoracique en troisième segment thoracique résultant en une duplication des peignes sexuels. Ces phénotypes résultent d'une expression ectopique des gènes homéotiques. En effet, chez les mutants du groupe *Pc*, les gènes *Antp*, *Scr*, *Ubx*, *abdA* et *AbdB* sont exprimés incorrectement (Beachy et al., 1985; Carroll et al., 1986; Wedeen et al., 1986; Riley et al., 1987; Celniker et al., 1989; Simon et al., 1992). La mutation du gène *extra sex comb* résulte en des transformations similaires à celles observées chez les mutants *Pc*, soit avec une expression ectopique des gènes *Ubx* et *Antp* (Struhl, 1983; Glicksman et Brower, 1988). Les produits des gènes *Polycomb*

joueraient un rôle de répresseur, pour restreindre l'expression de chaque gène homéotique à un domaine défini où son expression a été induite par les gènes de segmentation, en compactant localement la chromatine dans des structures stables d'hétérochromatine pour limiter l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. À l'opposé, les produits des gènes du groupe *trithorax* auraient pour rôle de faciliter l'accès de l'ADN aux molécules activatrices et à la machinerie transcriptionnelle (Kennison, 1993; Peterson et Tamkun, 1995). Ainsi le gène *brahma* contribue au complexe SWI/SNF de la drosophile qui permet le relâchement de la structure de la chromatine pour la rendre accessible à la machinerie transcriptionnelle. Le gène *brahma* antagonise donc le rôle répresseur des gènes *Pc* en facilitant l'accessibilité d'activateurs aux séquences régulatrices des gènes homéotiques (Pazin et Kadonaga, 1997). Ainsi, plusieurs modes de régulation sont nécessaires pour restreindre l'expression des gènes homéotiques à des régions spécifiques le long de l'axe de l'embryon et qui définissent le domaine fonctionnel de chacune des protéines homéotiques.

### 1.1.1.5. Les protéines homéotiques

Les gènes homéotiques partagent une séquence commune de 180 pb, appelée boîte homéo, découverte par homologie de séquence entre les gènes *Antp*, *ftz* et *Ubx* (McGinnis et al., 1984; Scott et Weiner, 1984). La séquence protéique codée par la boîte homéo, appelée domaine homéo, est une séquence protéique de soixante acides aminés organisée en structure hélice-tour-hélice capable de lier l'ADN de façon spécifique (Desplan et al., 1985; Hoey et Levine, 1988). Les produits des gènes homéotiques sont donc des facteurs de transcription qui contrôlent les destinées cellulaires en liant l'ADN, via leur domaine homéo, pour activer ou réprimer les gènes cibles appelés gènes réalisateurs (Affolter et al., 1990). Ainsi, la protéine Antennapedia reconnaît des séquences régulatrices activatrices des gènes *homothorax* et *eyeless* qui sont impliqués dans la formation des antennes et des yeux (Casares et Mann, 1998; Plaza et al., 2001). De même, une combinaison des protéines *Ubx* et *abdA* peut bloquer la transcription du gène *distal-less* dans l'abdomen (Castelli-Gair et Akam, 1995). Depuis sa découverte chez la drosophile, l'utilisation, comme sonde, de la séquence correspondante à la boîte homéo, a permis de mettre en évidence la présence de gènes homéotiques (gènes *Hox*) chez tous les métazoaires étudiés à ce jour.

## 1.2. Les gènes *Hox* des vertébrés

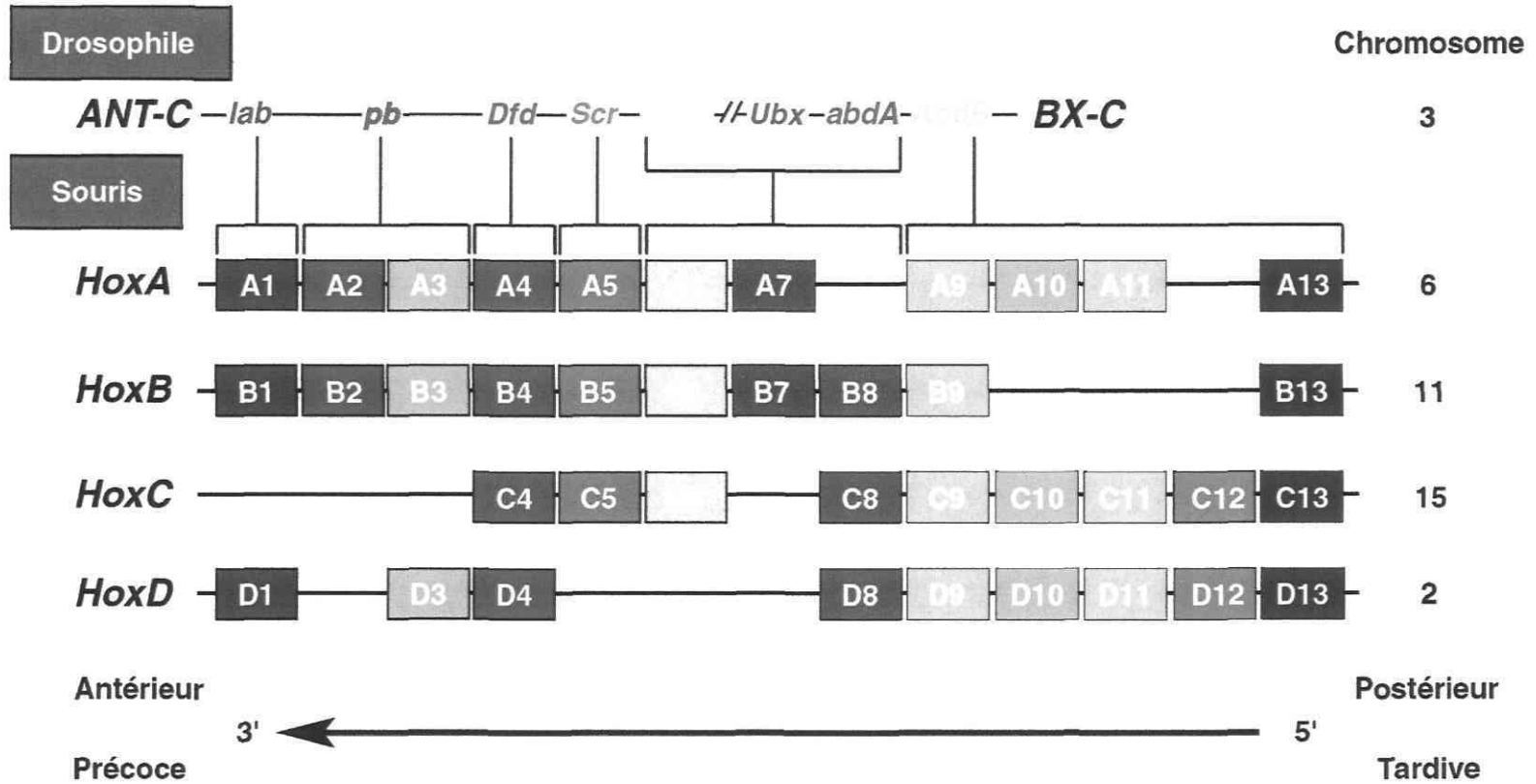
### 1.2.1. Organisation génomique des complexes *Hox* des vertébrés

Les analyses phylogénétiques moléculaires des séquences ont permis de mettre en évidence plusieurs classes distinctes de gènes à boîte homéo dont les deux classes principales sont constituées des gènes *Hox* de type *Antennapedia* (*Antp*) et des gènes de type *Paired* (PRD). On retrouve également des classes plus divergentes telles les LIM, POU, SINE et TALE (Holland et Takahashi, 2005). La classe TALE est inhabituelle car son domaine homéo contient 63 acides aminés au lieu de 60 (TALE = Three Amino acid Loop Extension). Récemment, des études de génomique comparative ont permis de subdiviser les gènes homéotiques de type *Antennapedia* en trois groupes : les gènes *Hox*, le complexe ParaHox et le complexe NK (Garcia-Fernandez, 2005).

La comparaison des gènes *Hox* suggère qu'ils dérivent tous d'un complexe ancestral commun (Valentine et al., 1996). C'est la complexification des organismes qui serait à l'origine de l'accroissement du nombre des gènes *Hox* chez les différentes espèces (Nam et Nei, 2005). En effet, une augmentation du nombre des gènes *Hox* permettrait l'augmentation de la complexité morphologique axiale (Ruddle et al., 1994). En particulier, l'apparition des chordés et des vertébrés corrélait avec la duplication des complexes. Chez les vertébrés, les gènes *Hox* auraient évolué en se dupliquant à deux reprises, ces événements ayant eu lieu très tôt dans l'évolution. La perte de gènes individuels serait un événement secondaire, le tout résultant en la présence de complexes *Hox* multiples (Hoegg et Meyer, 2005).

En conséquence, on retrouve chez l'humain et la souris, 39 gènes *Hox* de type *Antp*. Ces gènes sont organisés en quatre complexes, identifiés *HoxA* à *D*, qui sont localisés sur les chromosomes 7, 17, 12 et 2 chez l'humain, et 6, 11, 15 et 2 chez la souris (figure 1.3). Chacun des complexes comporte entre 9 et 11 gènes (McGinnis et Krumlauf, 1992). Par analyse de séquences, les gènes *Hox* ont été classés en 13 groupes de gènes paralogues qui présentent une homologie de séquence et des propriétés équivalentes puisque les produits des gènes d'un même groupe paralogue pourraient être fonctionnellement équivalents







(Greer et al., 2000). Ainsi, chacun des gènes peut avoir un ou plusieurs équivalents dans les autres complexes et être relié à un orthologue dans le complexe HOM-C de drosophile (figure 1.3).

Chez la souris, l'expression des gènes *Hox* est initiée au jour embryonnaire (E) 7.5, au niveau de la ligne primitive (PS), avec un domaine d'expression qui s'étend par la suite dans le tube neural et le mésoderme jusqu'à ce qu'une frontière rostrale prédéterminée soit atteinte (Deschamps et Wijgerde, 1993; Roelen et al., 2002; Oosterveen et al., 2003a). Comme cela a été démontré pour les gènes du complexe HOM-C, la conservation de l'organisation des gènes dans chaque groupe est associée à la conservation de leur expression spatio-temporelle durant l'embryogenèse (Lewis, 1978; Krumlauf, 1994). Autrement dit, les gènes situés en 3' des complexes présentent une expression plus précoce et dans des domaines plus antérieurs que les gènes situés plus en 5'. Chaque gène *Hox* étant exprimé dans des régions discrètes mais qui se chevauchent, il a été proposé que la combinaison spécifique des protéines *Hox* (qualitative et quantitative) dans une région donnée, définit une adresse génétique unique qui détermine les caractéristiques propres à cette même région (Kessel et Gruss, 1991). Cette adresse génétique, que l'on appelle code *Hox*, serait à l'origine du développement des différentes structures embryonnaires le long des axes (Duboule, 1998).

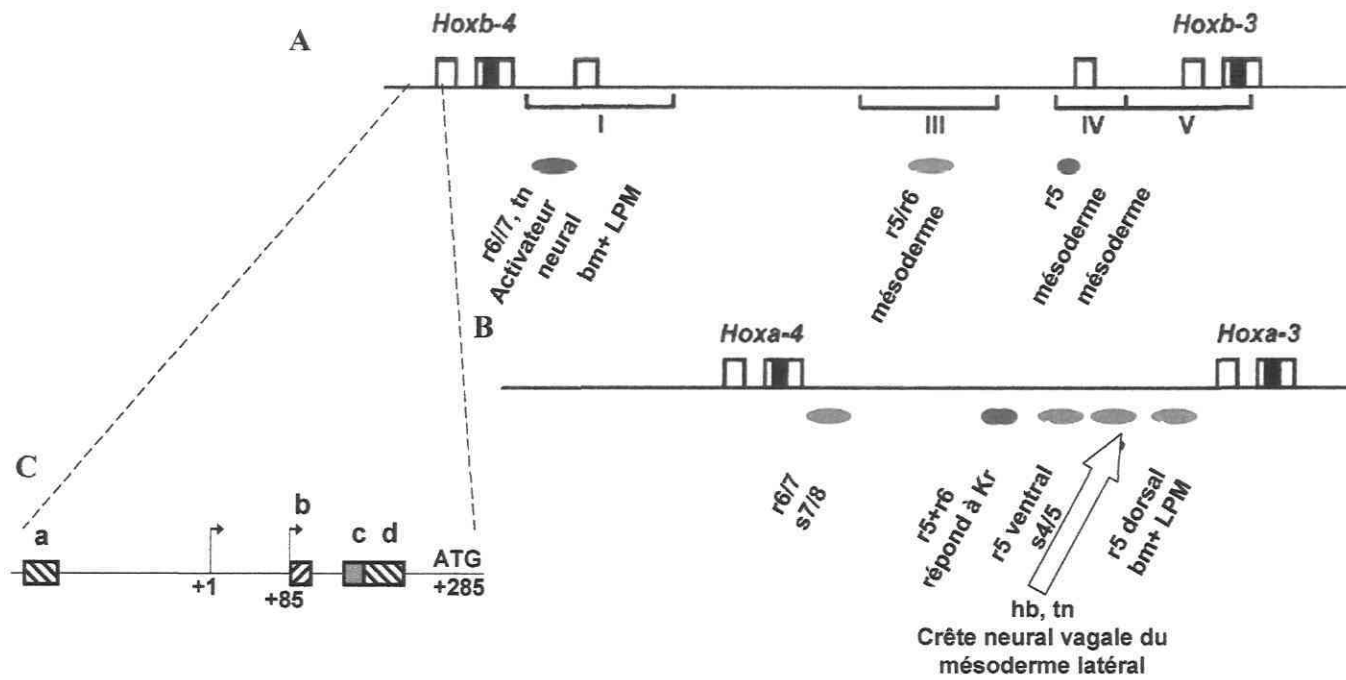
### **1.2.2. Régulation des gènes *Hox* des vertébrés**

Les mécanismes qui gouvernent l'expression spatio-temporelle des gènes *Hox* sont organisés selon une hiérarchie qui reflète les décisions développementales qui précèdent l'activation des gènes *Hox*. Une étape critique, dans la dissection de cette hiérarchie moléculaire, est l'examen de la régulation transcriptionnelle des gènes *Hox*. Elle nécessite d'isoler les éléments régulateurs situés en *cis* et d'identifier les facteurs agissant en *trans* qui lient ces séquences. L'activité de ces facteurs représente un des premiers niveaux de cette hiérarchie.

### 1.2.2.1. Régulation transcriptionnelle des gènes *Hox*

#### 1.2.2.1.1. Les séquences régulatrices situées en *cis* des gènes *Hox*

Les analyses des séquences régulatrices des gènes *Hox*, menées par transgénèse, ont permis d'identifier des séquences activatrices agissant localement. Ces dernières sont capables de reproduire en partie les patrons d'expression endogène spécifiques des gènes *Hox* qu'ils contrôlent. Par exemple, quatre régions régulatrices ont été décrites pour le gène *Hoxb3* (figure 1.4). Trois éléments neuraux sont nécessaires pour diriger l'expression précoce du gène dans le système nerveux central (SNC) dès le stade E8.5. L'un d'entre eux est responsable de l'expression neurale la plus antérieure dans le rhombomère (r) 5 (défini à la section 1.2.2.1.2.1) et un autre dirige l'expression neurale postérieure tardive (figure 1.4). Ce dernier élément est partagé avec le gène *Hoxb4*. Le quatrième élément dirige l'expression dans le mésoderme paraxial jusqu'au niveau de la première vertèbre cervicale, région qui s'avère être la limite antérieure du domaine d'expression du gène. Ainsi, la région intergénique de 22 kilobases (kb), située entre les gènes *Hoxb3* et *Hoxb4*, contient toutes les séquences régulatrices nécessaires pour l'expression du gène *Hoxb3* à différents moments du développement (Kwan et al., 2001). Concernant le gène *Hoxb4*, des études de transfection cellulaire ont permis de définir quatre éléments régulateurs (a, b, c et d) dont trois agissent de façon négative (figure 1.4). L'élément a agit de façon cellule spécifique puisqu'il agit de façon plus prononcée dans des cellules de carcinome embryonnaire comparées aux cellules de neuroblastome. Les éléments b et d, localisés en *cis* dans le 5' UTR, agissent en diminuant le niveau de production des ARNm. Les éléments a et d agissent de façon additive et peuvent réguler les deux promoteurs décrits pour le gène. Enfin, il existe aussi un élément régulateur positif c, situé en 3', qui est responsable du positionnement de la frontière antérieure dans le SNC (Gutman et al., 1994). L'ensemble des mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes *Hoxb3* et *Hoxb4* est présenté dans la figure 1.4 (Kwan et al., 2001). Par ailleurs, cinq séquences régulatrices sont nécessaires à l'expression adéquate du gène *Hoxa3* (figure 1.4) ; (Manzanares et al., 1999a). Enfin, des séquences régulatrices nécessaires à l'expression spécifique des gènes *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxa2* et *Hoxb2* dans le cerveau postérieur ont été rapportées (Sham et al., 1993; Marshall et al., 1994; Studer et al., 1994; Frasch et al., 1995; Pöpperl et al., 1995; Nonchev et al., 1996b; Manzanares et al., 1997; Manzanares et al., 1999a).

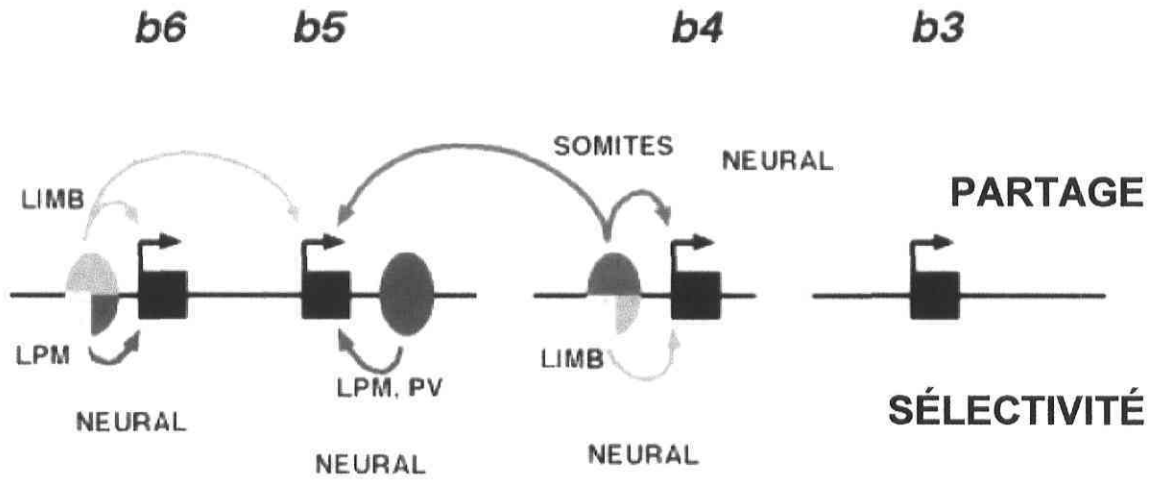


### 1.2.2.1.1.1 *Le partage et la sélectivité des séquences régulatrices entre gènes Hox voisins*

Le partage de séquences régulatrices est un mécanisme alternatif opérant en *cis* pour coordonner l'expressions de gènes *Hox* voisins. Ainsi, la mutation d'un élément responsable de l'expression du gène *Hoxd11* dans le mésoderme paraxial affecte aussi le niveau des transcrits du gène *Hoxd10* suggérant un partage de cet élément régulateur (Zákány et al., 1997b). De même, un autre élément régulateur du gène *Hoxd11*, partagé avec le gène *Hoxd10*, agit comme répresseur transcriptionnel pour limiter l'extension antérieure de l'expression des deux gènes le long de la colonne vertébrale (Gérard et al., 1996). De façon similaire, un élément positif, localisé dans l'intron du gène *Hoxb4*, peut fixer les frontières d'expression du gène dans le tube neural de la même façon que pour le gène *Hoxb5* suggérant à nouveau un partage de cette séquence et son implication dans la régulation des deux gènes (Whiting et al., 1991). Un élément activateur, situé dans la région intergénique, dirige l'expression des gènes *Hoxb4* et *Hoxb5* dans les somites (s) jusqu'à s7/8 (figure 1.5). Enfin, un élément activateur, préalablement décrit pour l'expression du gène *Hoxb6* dans les membres, est capable d'activer le promoteur du gène *Hoxb5* (Sharpe et al., 1998). Comme mentionné à la section 1.2.2.1.1, l'élément régulateur positif responsable du positionnement de la frontière antérieure du gène *Hoxb4* dans le SNC est partagé avec le gène *Hoxb3* (figure 1.5) ; (Gutman et al., 1994; Gould et al., 1997).

La capacité des gènes *Hox* à partager des éléments régulateurs soulève des questions sur les processus impliqués dans la spécificité des différents éléments régulateurs menant à l'établissement et à la maintenance de patrons d'expression spatio-temporelle distincts. La sélectivité, c'est à dire une incompatibilité entre certains éléments activateurs et certains promoteurs, pourrait être l'un d'entre eux. Ce mécanisme est illustré par l'élément régulateur, partagé avec le gène *Hoxb5*, pour l'expression du gène *Hoxb4* dans le tube neural et dans les membres. En effet, cet élément n'induit l'expression du gène *Hoxb5* que dans le tube neural suggérant une incompatibilité avec le promoteur du gène *Hoxb5* pour l'expression dans les membres (figure 1.5). De plus, cette même région montre une sélectivité temporelle vis-à-vis des promoteurs de ces deux gènes pour diriger l'expression dans le tube neural. En effet, l'expression du gène *Hoxb5* y est plus tardive que celle du gène *Hoxb4*. Pareillement, l'élément positif nécessaire pour l'expression des gènes *Hoxb5*

## Complexe HoxB



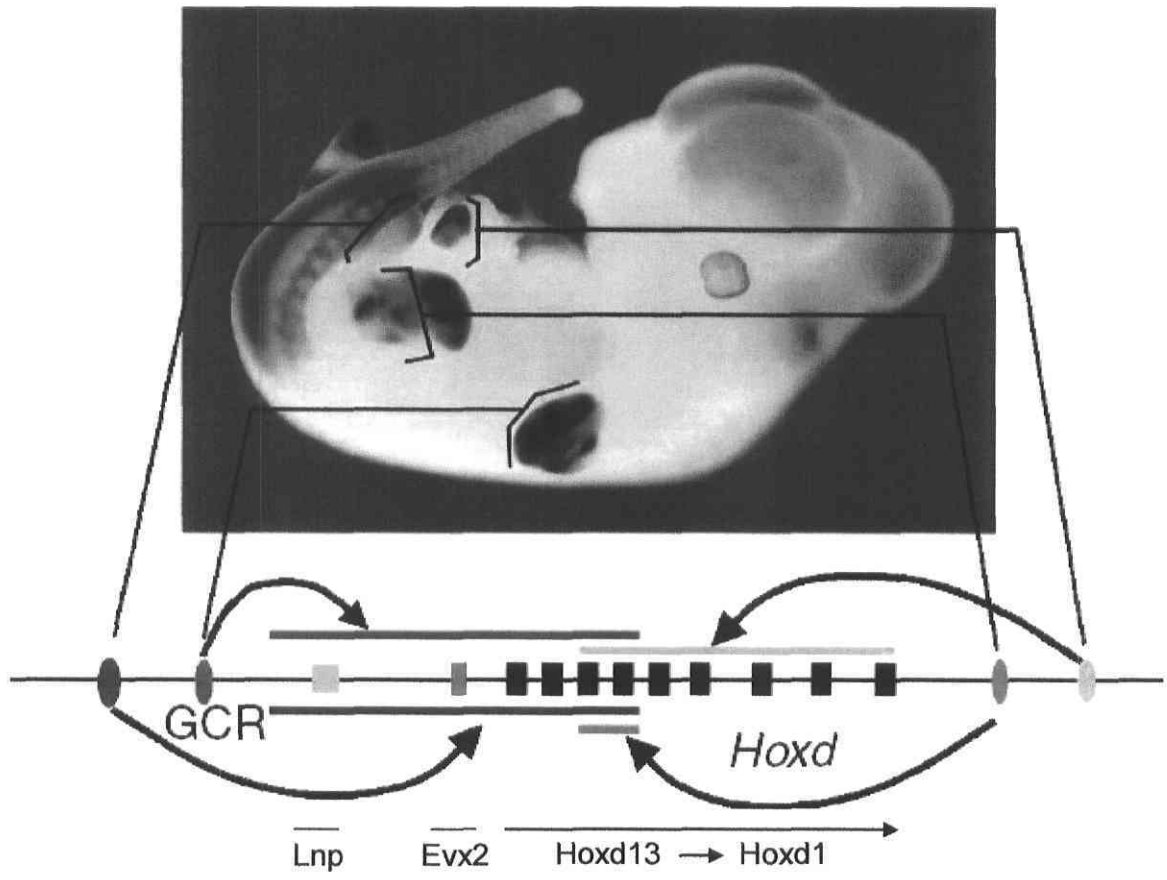
et *Hoxb6* dans les membres montre une sélectivité d'action pour l'expression du gène *Hoxb6* dans le SNC, les membres et le mésoderme (figure 1.5) ; (Sharpe et al., 1998). Un dernier mécanisme de régulation serait la compétition entre promoteurs. Par exemple, l'élément qui dirige l'expression neurale des gènes *Hoxb4* et *Hoxb5* active de façon identique les promoteurs des deux gènes lorsqu'ils sont testés individuellement. Par contre, lorsque les deux séquences promotrices sont testées en même temps, on observe une préférence pour le promoteur du gène *Hoxb4* (Sharpe et al., 1998).

En plus des séquences régulatrices situées à proximité des gènes, certaines études ont révélé la présence de séquences régulatrices localisées à distance des complexes des gènes *Hox*. Par exemple, un élément régulateur du gène *Hoxc8*, nécessaire pour le maintien de la frontière antérieure de l'expression dans le tube neural et les somites, est situé entre 11 et 19 kb en aval du site d'initiation du gène (Bradshaw et al., 1996). Les gènes *Hoxd10* à *Hoxd13* sont nécessaires pour le développement des membres et du système urogénital (Section 1.3.2.5) ; (Zákány et al., 1997b). Des gènes non *Hox*, *Evx2* et *lunapark* (*Lnp*), sont localisés en amont du gène *Hoxd13* et présentent tous deux une expression mésenchymale dans la partie distale du membre en développement ainsi que dans le bourgeon génital similaire à l'expression des gènes *Hoxd10* à *Hoxd13* (Spitz et al., 2003). La conservation de ces domaines d'expression entre les gènes localisés en 5' du complexe *HoxD* et des gènes situés en dehors du complexe est contrôlée par une région d'ADN agissant comme régulateur global localisée en 5' du gène *Lnp* (Spitz et al., 2001a). Cette région regrouperait différents éléments activateurs capables de diriger l'expression dans le tube neural, dans la partie distale des membres et dans le bourgeon génital, de gènes localisés dans le voisinage du gène *Hoxd13* entre les stades E10.5 et E13.5. L'élément activateur distal pour les membres a été situé dans une région de 54 kb localisée 200 kb en 5' du gène *Hoxd13* (Spitz et al., 2003). Une autre démonstration de la présence de cette région régulatrice globale provient de l'étude de la mutation du gène *ulnaless* où l'expression de plusieurs gènes *HoxD* postérieurs est perturbée sans qu'aucune modification structurale ne soit apparente au sein du complexe *HoxD*. La mutation *ulnaless* doit donc affecter cette région activatrice globale pour les membres (Hérault et al., 1997; Peichel et al., 1997). Ainsi, cette région activerait les gènes situés dans un domaine génomique donné plutôt que sur des promoteurs sélectionnés. Enfin, la séparation du complexe *HoxD*, entre les gènes *Hoxd10* et *Hoxd11*,

résulte en une partition des domaines d'expression des deux gènes suggérant que les gènes du complexe *HoxD* sont contrôlés par différentes séquences activatrices globales localisées de part et d'autre du complexe (figure 1.6). Après séparation du complexe, les gènes restent sous contrôle des activateurs par rapport auxquels ils n'ont pas été déplacés et perdent l'influence de ceux dont ils se sont éloignés (Spitz et al., 2005).

Par ailleurs, les gènes des complexes *Hox* doivent être isolés des éléments régulateurs externes qui contrôlent spécifiquement les gènes avoisinants aux complexes *Hox*. Ainsi, le gène *Hoxd9* est capable de répondre à l'activateur neural du gène *Evx2* environnant quand il est placé en dehors du complexe alors qu'il en est incapable lorsqu'il est placé au sein du complexe (van der Hoeven et al., 1996; Kondo et Duboule, 1999). L'isolation du complexe *HoxD* de l'influence des séquences régulatrices du gène *Evx2* serait spécifique au tissu et se ferait par l'intermédiaire de deux séquences localisées autour du locus du gène *Hoxd12* (Kmita et al., 2002a; Kmita et al., 2002b). De plus, cette même région, située entre les gènes *Hoxd12* et *Hoxd13*, empêche ces deux gènes de répondre à un élément régulateur pour l'expression au niveau de l'hernie intestinale (figure 1.6) ; (Kmita et al., 2000a).

L'ensemble des études menées sur l'identification des séquences régulatrices démontre l'importance de la mise en place de nombreux mécanismes distincts pour s'assurer que chacun des gènes *Hox* soit exprimé de façon adéquate dans le temps et l'espace. Cette expression spatio-temporelle est indispensable à la fonction des gènes *Hox*. Les différents mécanismes, démontrés à ce jour, font intervenir la multiplication des séquences activatrices pour cibler l'expression d'un gène *Hox* donné dans les différentes régions de l'embryon où il doit être exprimé. C'est l'existence de gènes organisés en complexe qui aurait favorisée la décision du partage des séquences régulatrices amenant ainsi une augmentation du niveau de complexité de la régulation tout en maintenant la contrainte de la conservation de cette organisation génomique. Ce partage de séquences régulatrices entre gènes adjacents aurait entraîné la mise en place d'une sélectivité de certains de ces éléments par rapport aux différents promoteurs et la mise en place d'éléments de contrôle global. Ces activateurs définissent des territoires de régulation qui





se chevauchent et qui doivent représenter une forte contrainte évolutive pour maintenir les gènes du complexe *HoxD* ensemble. Bien qu'aucune évidence expérimentale n'ait été rapportée, on ne peut exclure la possibilité que de tels mécanismes s'appliquent aux trois autres complexes *Hox*. Enfin, la fonctionnalité de ces séquences régulatrices fait intervenir la liaison de facteurs agissant en *trans* qui seront décrits dans la section suivante.

#### 1.2.2.1.2. Les facteurs agissant en *trans* sur les séquences régulatrices des gènes *Hox*

Les gènes *Hox* sont impliqués dans de nombreux processus de segmentation dont la spécification de l'identité AP. Etant donné leur rôle dans la spécification vertébrale, les gènes *Hox* apparaissent être des cibles communes à différents facteurs impliqués dans ce processus. Parmi ceux-ci, on retrouve l'acide rétinoïque, les protéines *Krox20* et *Kreisler*, les membres des voies de signalisation Wnt et FGF, les protéines *Cdx*, les protéines *Pbx* et *Meis* ainsi que les produits des gènes *Hox* eux-mêmes.

Chez les vertébrés, certains facteurs présents lors de la gastrulation ont été proposés comme étant des inducteurs potentiels des gènes *Hox*. Grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs, il a été possible de reproduire les patrons d'expression d'un certain nombre de gènes *Hox* situés en 3' des complexes de façon similaire à leur patron d'expression endogène. Le mécanisme commun, utilisé par plusieurs gènes *Hox* situés en 3' des complexes, est une activation précoce des gènes par action transitoire de facteurs de transcription tels *Krox20*, *Kreisler* ou les récepteurs des rétinoïdes. Cette étape serait suivie par la maintenance des domaines d'expression via des mécanismes d'auto- et/ou de régulation croisée entre les gènes *Hox* eux-mêmes (Manzanares et al., 2001). En revanche, il a été impossible de reproduire les frontières antérieures des patrons d'expression des gènes *Hox* situés plus en 5' des complexes. C'est le cas pour les gènes *Hoxb6* et *Hoxb8* alors que des séquences activatrices, qui dirigent l'expression axiale de ces gènes, ont été décrites (Schughart et al., 1991; Vogels et al., 1993; Charité et al., 1998). Ceci suggère que l'expression de ces gènes dépendrait d'autres mécanismes de régulation, faisant notamment intervenir des interactions à longue distance et/ou le partage de régions de contrôle distales comme cela a été suggéré dans les membres pour les gènes du complexe *HoxD* (décrit à la section 1.2.2.1.1) ou dans le SNC et le mésoderme pour les gènes du complexe *HoxB* (van der Hoeven et al., 1996; Gould et al., 1997; Sharpe et al., 1998). De plus, les mécanismes

de régulation en *cis* et les sentiers de signalisation dirigeant les gènes *Hox* situés en 3' des complexes par rapport aux gènes localisés en 5' pourraient être différents et refléter les variations dans la spécification de la tête par rapport au tronc. Certains modes de régulation mis en évidence pour diriger l'expression des gènes *Hox* sont décrits dans les sections suivantes.

#### **1.2.2.1.2.1. L'acide rétinoïque**

Plusieurs évidences supportent un rôle de l'acide rétinoïque (RA), ou des rétinoïdes apparentés, comme facteurs modulant la transcription précoce des gènes *Hox* (Kessel et Gruss, 1991; Lohnes et al., 1993; Lohnes et al., 1994; Marshall et al., 1994; Dupé et al., 1997; Morrison et al., 1997; Studer et al., 1998; Folberg et al., 1999). Le RA joue un rôle prépondérant dans la spécification des frontières des rhombomères pré-otiques en contrôlant l'expression des gènes *Hox* à l'intérieur de ce territoire (Gavalas et Krumlauf, 2000; Niederreither et al., 2000). Dans le cerveau postérieur, l'épithélium neural embryonnaire est caractérisé morphologiquement par une série particulière de 7 rhombomères (r) dans lesquels les gènes *Hox* sont exprimés de façon ordonnée, avec des limites d'expression qui coïncident avec les frontières des rhombomères (Wilkinson et al., 1989). L'effet du RA sur les gènes *Hox* situé en 3' des complexes et sur la spécification du tube neural provient essentiellement du RA issu des somites adjacents entre E8.0-8.25 (Gould et al., 1998). Le RA est synthétisé par l'enzyme rétinal déshydrogénase 2 (*Raldh2*) à l'intérieur du mésoderme proximal en développement et induit l'expression des gènes *Hox* dans le tube neural adjacent. Plusieurs gènes *Hox* présentent des éléments de réponse au RA (RARE) dans leurs séquences régulatrices qui sont liés par les RAR (récepteurs de l'acide rétinoïque) et RXR (récepteurs des rétinoïdes X). De façon générale, la production ectopique de RA provoque une antériorisation du domaine d'expression des gènes *Hox* alors qu'une réduction du RA entraîne généralement une postériorisation des domaines d'expression des gènes *Hox* (Studer et al., 1998).

La contribution *in vivo* des RAREs a été étudiée dans le contexte de transgènes *lacZ* ou de mutations ciblées à l'intérieur du locus endogène. Ainsi, la délétion du RARE dans les régions régulatrices du gène *Hoxa1* entraîne des phénotypes similaires à ceux observés chez les individus où la fonction du gène a été abolie, c'est-à-dire, des anomalies au niveau

des rhombomères et des nerfs crâniens (Section 1.3.2.1). Cependant, le phénotype est moins sévère suggérant l'action d'autres éléments régulateurs. De plus, la mutation du RARE affecte aussi l'expression du gène *Hoxa2* dans r5 suggérant un partage de cette séquence régulatrice entre les deux gènes. Pour sa part, le gène *Hoxb1* présente trois RARE fonctionnels. La destruction du RARE 3' proximal affecte l'expression précoce du gène dans l'ectoderme neural des embryons au stade E7.5 alors que la mutation du RARE 3' distal éteint spécifiquement l'expression tardive du gène dans la région de l'intestin antérieur (Huang et al., 1998; Studer et al., 1998). Le RARE situé en 5' fonctionne comme répresseur de l'expression du gène *Hoxb1* dans r3 et r5 (Studer et al., 1994). Il est à noter que le RARE 3' proximal est nécessaire à l'établissement de l'expression du gène *Hoxb1* dans r4, un site qui lui est spécifique dans le cerveau postérieur, et ce de façon dépendante de l'activation du gène *Hoxa1* et *Hoxb1* par les rétinoïdes endogènes (Studer et al., 1998). De façon similaire, des RAREs fonctionnels ont été rapportés dans les séquences régulatrices des gènes *Hoxa4*, *Hoxb4* et *Hoxd4* (Morrison et al., 1996; Folberg et al., 1997; Gould et al., 1998; Packer et al., 1998). La présence de RAREs fonctionnels dans les séquences régulatrices des gènes du groupe paralogue 4 démontre l'importance de ces séquences puisqu'il y a eu nécessité de les conserver au cours des événements de duplication à partir du complexe ancestral. L'étude de la perte de fonction du gène *Raldh2* supporte les études précédentes puisqu'elle résulte en une expression altérée du gène *Hoxa1* similaire à celle observée avec la mutation ciblée du RARE (Dupé et al., 1997; Niederreither et al., 1999). Récemment, il a été montré que cette inactivation du gène *Raldh2* entraîne une baisse significative de l'expression du gène *Hoxa5* au niveau des poumons et de l'estomac et que l'expression du gène peut être partiellement restaurée par un traitement à l'acide rétinoïque des mères pendant la gestation (Wang et al., 2006).

Bien que la biosynthèse du RA et que l'expression des gènes en 3' des complexes *Hox* présentent un chevauchement dans leurs domaines d'expression dans le cerveau postérieur, la situation est moins évidente concernant l'action du RA sur l'expression des gènes *Hoxb5* à *Hoxb8*. En effet, ces gènes sont exprimés dans le cerveau postérieur à un stade du développement où la *Raldh2* n'est plus exprimée donc où le RA n'est plus synthétisé (Oosterveen et al., 2003a). Une hypothèse serait que les domaines d'expression de ces gènes *Hoxb* localisés plus en 5' du complexe s'étendraient dans le cerveau postérieur

entre E9.5 et E11.5 jusqu'à la localisation des transcrits de la *Raldh2* présents dans le mésenchyme cervical (Niederreither et al., 2000; Oosterveen et al., 2004). Enfin, bien que les gènes *Hox* apparaissent comme étant des cibles du RA, il appert que la régulation entre le RA et les gènes *Hox* soit bidirectionnelle puisque le RAR $\beta$  serait une cible des gènes *Hoxb4* et *Hoxc8* (Serpente et al., 2005; Vermot et al., 2005).

#### **1.2.2.1.2.2. Les produits des gènes *Krox20* et *Kreisler***

Comme les gènes *Hox* et les RAR, les facteurs de transcription *Kreisler* et *Krox20* sont impliqués dans la spécification des rhombomères. Les études par transgénèse des éléments régulateurs des gènes *Hox* ont mis en évidence que les facteurs *Kreisler* et *Krox20* jouent un rôle crucial en contrôlant directement l'expression rhombomérique de plusieurs gènes *Hox*. Ainsi, *Krox20*, une protéine à doigt de zinc exprimée exclusivement dans r3 et r5, contrôle spécifiquement les gènes *Hoxa2* et *Hoxb2* dans ces rhombomères. Ceci se fait via des sites de liaison conservés présents dans des séquences activatrices localisées en amont de ces gènes (Nonchev et al., 1996a; Nonchev et al., 1996b; Vesque et al., 1996). De façon intéressante, *Krox20* est également contrôlé par des gènes *Hox* puisqu'il est initialement réprimé par les gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* dans r5 pour ne permettre son expression qu'une fois l'expression des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* rétractée (Barrow et al., 2000). Dans r3, on observe une synergie entre les gènes *Hoxa1* et *Krox20* pour la spécification du rhombomère (Helmbacher et al., 1998).

De façon similaire *Kreisler*, une protéine Maf/basic leucine zipper exprimée spécifiquement dans r5 et r6, est requise pour la formation de r5. Elle contrôle l'expression des gènes *Hoxb3* et *Hoxa3* dans r5 et r6 en liant directement les séquences régulatrices de ces gènes (figure 1.4) ; (Moens et al., 1996; Manzanares et al., 1997; Moens et al., 1998; Manzanares et al., 1999a; Manzanares et al., 1999b). La mutation du gène *Kreisler* est en adéquation avec le rôle de régulateur de l'expression des gènes *Hox* dans le cerveau postérieur puisqu'elle résulte en une organisation anormale du cerveau postérieur (Frohman et al., 1993; McKay et al., 1994). Dans r5, l'expression conjointe de *Krox20* et *Kreisler* agit en synergie pour activer spécifiquement un élément activateur du gène *Hoxb3* (Manzanares et al., 2002). Un élément régulateur positif qui répond à *Kreisler* a également été décrit, situé entre les gènes *Hoxa3* et *Hoxa4*, pour l'expression du gène *Hoxa3* dans r5 et r6

(Manzanares et al., 1999a). Enfin, l'acide rétinoïque joue une partie de son rôle dans la spécification de l'identité des rhombomères en agissant sur l'expression des gènes *Krox20*, *Kreisler* et *Hox* (Maves et Kimmel, 2005).

#### **1.2.2.1.2.3. Les sentiers de signalisation FGF et Wnt**

Plusieurs évidences proposent un rôle de régulateur des membres des FGF (Fibroblast Growth Factors) sur l'expression des gènes *Hox*. Ainsi, chez les individus où la fonction des récepteurs FGF est atténuée, comme dans le cas de la mutation hypomorphe de *Fgfr1*, le domaine d'expression des gènes *Hoxd4* et *Hoxb9* est déplacé postérieurement dans le mésoderme latéral suggérant un rôle des FGF dans la spécification de l'axe AP du mésoderme (Partanen et al., 1998). Ces dernières années, il a été rapporté la présence de centres inducteurs tels que l'isthme qui est situé à la jonction du cerveau moyen et du cerveau postérieur. Ces centres inducteurs joueraient un rôle dans la spécification neurale antérieure. Lors d'une greffe de la région de l'isthme dans une région plus postérieure, on observe une inhibition de l'expression du gène *Hoxa2* dans les cellules de la crête neurale (CCN) du deuxième arc branchial. Cette inhibition du gène *Hoxa2* par l'isthme est importante, car la mutation du gène *Hoxa2* se traduit par des transformations homéotiques des dérivés de ce deuxième arc branchial en ceux normalement dérivés du premier arc branchial. Ainsi, le gène *Hoxa2* semble sensible au FGF produit par la région de l'isthme, notamment *Fgf8*, pour la spécification du deuxième arc branchial (Trainor et al., 2002). De même, l'utilisation de greffe hétérotopique caille/poulet a permis de mettre en évidence que l'expression ectopique, ou l'inhibition de *Fgf8* normalement produit par l'isthme, joue un rôle de répresseur de l'expression du gène *Hoxa2* dans le tube neural pour définir sa frontière antérieure au niveau de r1/r2 en réprimant son expression dans r1 (Irving et Mason, 2000). Ces auteurs proposent que le patron d'expression axial des gènes *Hox* dans le cerveau postérieur serait déterminé par des gradients opposés de morphogène activateur (RA) et de morphogène inhibiteur (FGF). Ce dernier prédominerait dans r1 pour qu'aucun gène *Hox* n'y soit exprimé. Toujours dans la région du cerveau postérieur, on retrouve une population unique de cellules localisées dans la partie caudale de la plaque neurale dans une région appelée zone souche du nœud. Ces cellules épiblastiques prolifèrent et se réarrangent de façon adjacente à la ligne primitive en régression, laissant des progéniteurs

qui pourront générer le tube neural (Diez del Corral et Storey, 2004). Les FGF auraient pour fonction de maintenir ces cellules dans un état indifférencié qui serait important pour permettre aux molécules de signalisation, et aux gènes *Hox*, de spécifier ces cellules (Liu et al., 2001; Delaune et al., 2005). De plus, l'exposition de l'embryon ou du tissu neural caudal aux FGF peut promouvoir l'expression du gène *Hoxb8* suggérant qu'une phase initiale de l'expression du gène *Hoxb8* répond aux FGF (Bel-Vialar et al., 2002; Delfino-Machín et al., 2005). L'initiation de l'expression des gènes *Hox* plus caudaux dans la zone souche serait donc dépendante du FGF. Par la suite, il y aurait un changement et les tissus en différenciation deviendraient dépendants des rétinoïdes dérivés des somites (Diez del Corral et Storey, 2004). Ainsi, la production de nouveaux tissus dans la zone souche du noeud serait sous contrôle du FGF où progressivement des gènes *Hox* plus caudaux sont exprimés. Le RA produit des somites atténuerait la signalisation FGF lorsque les cellules quittent la zone souche pour former le tube neural.

Bien que l'exposition au RA dans le tube neural ait été montrée comme requise pour l'expression des gènes *Hox* plus en 3' des complexes (comme *Hoxb4* ou *Hoxc5*) alors que les gènes les plus en 5' requièrent plutôt une signalisation via les FGF, il arrive, selon le contexte que certains gènes *Hox* soient induits par les deux reflétant la complexité de la régulation des gènes *Hox* (Gould et al., 1998; Pownall et al., 1998; Liu et al., 2001; Diez del Corral et Storey, 2004).

Une autre famille de molécules agissant sur les domaines d'expression des gènes *Hox* est la famille des molécules de signalisation *Wnt*. Dans la voie canonique, l'occupation du récepteur Frizzled par le ligand Wnt provoque la stabilisation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique qui peut alors se rendre au noyau et s'associer avec les membres de la famille de facteurs de transcription Tcf/Lef pour activer la transcription de gènes cibles. Tcf1 et Lef1 sont les principaux effecteurs de la cascade de la signalisation *Wnt* dans la ligne primitive et le bourgeon de la queue où ils sont co-exprimés avec les gènes *Cdx*. Les mutants *Wnt3a* et l'hypomorphe pour le gène *Wnt3a*, soit le mutant *vestigial tail (vt)*, exhibent des défauts au niveau vertébral associés à une postériorisation de l'expression des gènes *Hoxd3*, *Hoxb4* et *Hoxd13* (Ikeya et Takada, 2001). Toutefois, aucun site de liaison Tcf/Lef fonctionnel dans les régions régulatrices des gènes *Hox* n'a été rapporté à ce jour.



Par ailleurs, plusieurs études montrent que l'action des voies de signalisation FGF et Wnt sur les gènes *Hox* ne serait pas due à une action directe mais ferait intervenir des intermédiaires parmi lesquels on retrouve les membres de la famille des gènes *Cdx* (Pownall et al., 1996; Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1998; Bel-Vialar et al., 2002; Walshe et al., 2002). Le rôle des protéines Cdx, sur la régulation spatio-temporelle des gènes *Hox*, sera détaillé dans la section suivante.

#### **1.2.2.1.2.4. Les produits des gènes *Cdx* régulent l'expression des gènes *Hox***

Les gènes *Cdx* sont les homologues du gène *Caudal* chez la drosophile où l'ARNm du gène *caudal* est exprimé de façon ubiquitaire avant qu'un gradient AP ne se développe dans le blastoderme syncytial et persiste jusqu'au début de la cellularisation. L'expression zygotique, est localisée dans la région postérieure qui donne naissance aux structures abdominales terminales et à l'intestin postérieur. Par la suite, l'expression du gène *caudal* est retrouvée dans l'intestin moyen et postérieur (Macdonald et Struhl, 1986; Mlodzik et Gehring, 1987). Trois homologues sont présents chez la souris, soit *Cdx1*, *Cdx2* et *Cdx4*. Des sites consensus de liaison pour les protéines Cdx, A/CTTTATAA/G, sont retrouvés dans les régions régulatrices de 18 des 39 gènes *Hox* (Margalit et al., 1993).

Les transcrits du gène *Cdx1* sont détectés dès E7.5 dans l'ectoderme et le mésoderme naissant dans la région de la ligne primitive (PS) ; (Meyer et Gruss, 1993). Au stade E7.75, dans le tube neural, l'expression s'établit avec une frontière antérieure au niveau du sulcus pré-otique dans le cerveau postérieur présomptif et présente une expression légèrement plus postérieure dans le mésoderme. L'expression du gène *Cdx1* dans l'ectoderme neural régresse par la suite pour s'établir au niveau de la corde spinale présomptive. A l'intérieur de l'ectoderme neural, le gène *Cdx1* devient localisé dans la région dorsale du repli neural et dans quelques populations de CCN. Le gène *Cdx1* est aussi exprimé dans le mésoderme paraxial naissant et dans les somites où l'expression est restreinte au dermamyotome au stade E10.5. Au stade E9.5, les transcrits *Cdx1* sont retrouvés dans le mésenchyme des bourgeons des membres antérieurs, puis de façon plus faible, dans ceux des membres postérieurs à E10.5 (Meyer and Gruss, 1993). La mutation du gène *Cdx1* entraîne des transformations d'antériorisation du squelette axial dans la région cervico-thoracique entre la première vertèbre cervicale et la huitième vertèbre

thoracique. En accord avec les transformations homéotiques observées, la perte de fonction du gène *Cdx1* entraîne une postériorisation dans les domaines d'expression de certains gènes *Hox*, notamment une postériorisation des domaines d'expression des gènes *Hoxc6* et *Hoxa7*. De plus, le gène *Cdx1* est capable de transactiver le gène *Hoxa7* (Subramanian et al., 1995).

L'expression du gène *Cdx2* débute au stade E3.5 dans le trophectoderme du blastocyste et se poursuit jusqu'à E12.5 (Beck et al., 1995). Au stade E8.5, l'expression du gène *Cdx2* débute dans la PS, à la base de l'allantois, dans la plaque neurale postérieure, dans l'endoderme de l'intestin postérieur et le mésoderme paraxial non segmenté. L'expression se poursuit dans le bourgeon de queue comme pour le gène *Cdx1* puis disparaît dans ce tissu vers E12.5 (E12.0 pour *Cdx1*). La perte de fonction pour le gène *Cdx2* se traduit par une mortalité embryonnaire au stade E3.5 associée à un défaut d'implantation des embryons. Les individus hétérozygotes (HT) survivent et présentent des transformations homéotiques similaires à celles observées pour la perte de fonction du gène *Cdx1*. Les individus HT sont également caractérisés par le fait qu'ils sont plus petits à la naissance et qu'ils présentent une queue raccourcie (Chawengsaksophak et al., 1997). Lorsque le défaut d'implantation est surmonté par une fusion tétraploïde, on obtient des individus *Cdx2*<sup>-/-</sup> qui présentent des anomalies du développement du mésoderme extra-embryonnaire. La croissance déficiente de l'allantois, qui ne peut pas fusionner avec le chorion, entraîne une mort vers E11.5. Chez ces individus, on observe une réduction du niveau d'expression des gènes *Hoxb1* et *Hoxd4*. Au stade le plus avancé du développement des embryons *Cdx2*<sup>-/-</sup>, la frontière antérieure du gène *Hoxb8* est déplacée postérieurement de deux somites pour s'établir à s13 dans le mésoderme et s7 dans l'ectoderme neural. Enfin, la perte de fonction du gène *Cdx2* entraîne une perte complète de l'expression du gène *Cdx4* au stade 10 somites suggérant une régulation croisée entre *Cdx2* et *Cdx4* tout comme l'effet répresseur du gène *Cdx2* sur le gène *Cdx1* décrit *in vitro* (Lorentz et al., 1997; Chawengsaksophak et al., 2004).

Chez les individus *Cdx1*<sup>-/-</sup>*Cdx2*<sup>+/-</sup>, on retrouve des anomalies du squelette et des altérations des domaines d'expression des gènes *Hox* de façon plus prononcée que chez les simples mutants suggérant un synergisme entre les deux gènes dans la spécification du



squelette axial (van den Akker et al., 2002). Les gènes *Cdx1* et *Cdx2* sont aussi exprimés dans l'endoderme de l'intestin postérieur puis au niveau du colon. Toutefois, seule la perte de fonction du gène *Cdx2* a un impact sur le colon bien que les deux gènes soient exprimés dans les cellules de la crypte suggérant un rôle distinct de ces deux gènes ou un rôle prédominant de *Cdx2* dans cet organe (Freund et al., 1998).

Enfin, le gène *Cdx4* est exprimé dès le stade E7.5 de façon faible dans l'allantois et la partie postérieure de la PS. Dans le mésoderme paraxial, on retrouve son expression avec une frontière antérieure située de façon postérieure au somite dernièrement formé, et une frontière dans l'ectoderme neural légèrement plus antérieure. Au stade E10.5, on ne retrouve plus aucune expression du gène *Cdx4* dans la partie postérieure de l'embryon (Gamer et Wright, 1993). Le gène *Cdx4* est localisé sur le chromosome X et est donc normalement inactivé sur l'un des chromosomes X chez les femelles (Horn et Ashworth, 1995). La mutation du gène *Cdx4* résulte en des individus en santé et le rôle du gène *Cdx4* ne devient apparent qu'en collaboration avec les mutations des autres gènes *Cdx*. Ainsi, chez les individus *Cdx2*<sup>+/-</sup>, la déficience au niveau du labyrinthe du placenta est dépendante de la dose de gène *Cdx4* présente. Enfin, la contribution du gène *Cdx4* sur la spécification du squelette axial est modeste et n'est détectable qu'en association avec les mutations des gènes *Cdx1* et *Cdx2* (van Nes et al., 2006).

La régulation spatio-temporelle des gènes *Hox*, via la liaison de protéine Cdx sur les régions régulatrices des gènes *Hox*, est relativement bien documentée. Ainsi, le gène *Hoxa7* contient deux éléments de réponse à Cdx (CDRE) dans une région nécessaire pour l'établissement de la limite antérieure du gène *Hoxa7* pendant le développement (Knittel et al., 1995). La délétion de l'un de ces CDRE entraîne une baisse de réponse à *Cdx1* (Subramanian et al., 1995). L'expression du gène *Hoxc8* est sous le contrôle d'une séquence activatrice pour son expression précoce dans le tube neural. Cette séquence contient trois sites de liaison pour les protéines Cdx (Shashikant et al., 1995). On retrouve également un CDRE dans une séquence régulatrice du gène *Hoxb8* qui présente un rôle pour l'expression spatiale adéquate des rapporteurs dans le mésoderme et l'ectoderme neural jusqu'à une frontière antérieure dans le mésoderme correspondant à pv10. En effet, les transgènes *Hoxb8/lacZ* sont exprimés avec un domaine d'expression dont la limite

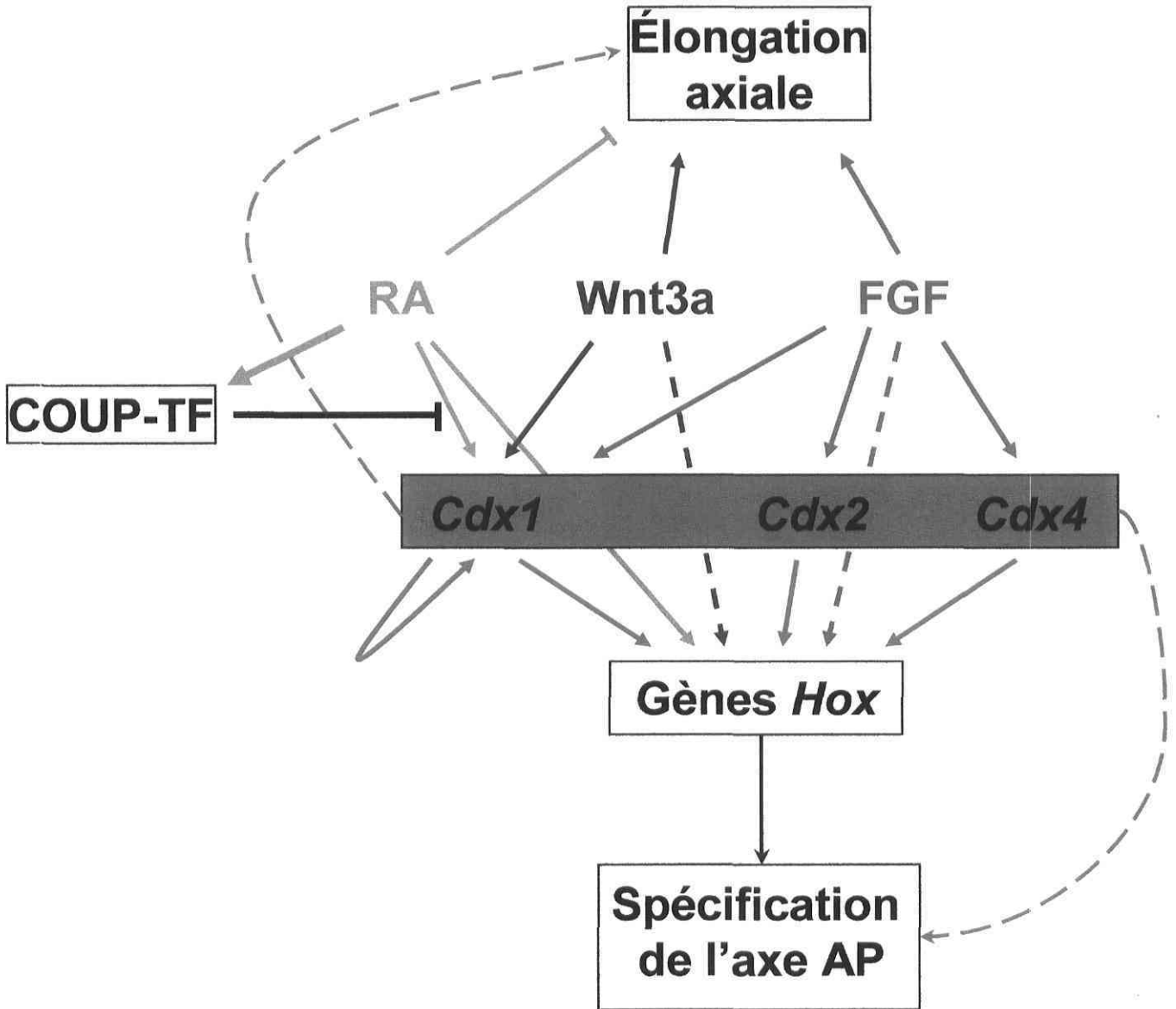
rostrale s'antériorise de façon proportionnelle au nombre de CDRE présents dans les constructions utilisées. Ceci suggère que les protéines Cdx sont des transducteurs physiologiques de l'information positionnelle aux gènes *Hox*. Ainsi, les protéines Cdx pourraient agir comme gradient de morphogène et le nombre de CDRE dans les transgènes influencerait la concentration de protéines Cdx pouvant activer le transgène (Charité et al., 1998; Gaunt, 2000). De plus, l'expression ectopique du gène *Cdx4* est capable d'activer une expression ectopique du gène *Hoxb8* et l'effet de la séquence activatrice est dépendant de l'intégrité des CDRE (Charité et al., 1998). Des résultats similaires ont été rapportés pour le gène *Hoxa7* pour lequel deux régions activatrices présentent des CDRE conservés entre la souris et le poulet (Knittel et al., 1995; Haerry et Gehring, 1996). Ainsi, l'ajout de trois copies de cette région activatrice dans des transgènes *Hoxa7/lacZ* résulte en une extension antérieure de l'expression dans les ganglions spinaux, l'ectoderme neural, le mésoderme paraxial et le mésoderme de la plaque latérale. De plus, comme pour le gène *Hoxb8*, les effets liés à la multimérisation des éléments régulateurs sont inhibés par la mutation des CDRE (Charité et al., 1998; Gaunt et al., 2004). De façon plus surprenante, cette multimérisation de séquences activatrices se traduit également par une expression plus précoce des transgènes (Gaunt et al., 2004).

Plusieurs études chez *Xénope* suggèrent, comme mentionné à la section 1.2.2.1.2.3, que les protéines Cdx seraient des intermédiaires pour acheminer la signalisation FGF aux gènes *Hox*. Ainsi, la surexpression de *eFGF* entraîne une suppression de la tête et un élargissement de la partie postérieure des embryons (Isaacs et al., 1998). Cette même surexpression de *eFGF* provoque une extension antérieure du domaine d'expression du gène *XCad3* (homologue du gène *Cdx4* chez *Xénope*) et des gènes *Hoxb9*, *Hoxa7* et *Hoxc6*. D'autre part, en absence de *eFGF*, une injection d'ARNm du gène *Xcad3* permet de retrouver l'expression du gène *Hoxa7*. Enfin, la surexpression du gène *Xcad3* entraîne une antériorisation des domaines d'expression des gènes *Hox* du tronc comme *Hoxb9* et *Hoxa7*, mais réprime l'expression des gènes *Hox* du cerveau postérieur comme *Hoxb1* et *Hoxb3*. La signalisation FGF serait requise pour l'expression des membres de la famille des gènes *Cdx* dans l'axe dorsal en développement alors que les gènes *Cdx* réguleraient l'expression des gènes *Hox* postérieurs pendant le développement embryonnaire normal. Toutefois, la répression des gènes *Hox*, localisés plus en 3' des complexes, ne serait pas directe mais

serait une résultante de l'antériorisation des domaines d'expression des gènes *Hox* plus postérieurs et de la prévalence postérieure (Pownall et al., 1996; Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1998). Cette notion de prévalence postérieure sera détaillée à la section 1.2.2.1.2.7.

De même, les membres de la famille des gènes *Cdx* seraient des intermédiaires de la signalisation *Wnt* puisque le gène *Cdx1* serait une cible de la signalisation *Wnt*/β-caténine. En effet, l'expression du gène *Cdx1* dans l'intestin embryonnaire est contrôlée par le complexe Tcf4/β-caténine qui reconnaît une région régulatrice de *Cdx1* qui contient deux sites de réponse à Tcf ainsi qu'un site RARE (Lickert et al., 2001). La mutation du RARE montre un rôle du RA dans l'initiation de l'expression du gène *Cdx1*. La mutation des sites de liaison *Wnt*/β-caténine révèle leur implication dans l'initiation de l'expression du gène *Cdx1* à E7.5 (Lickert et Kemler, 2002). De plus, l'expression du gène *Wnt3a* se superpose à celle du gène *Cdx1* dans la partie caudale de l'embryon et les mutants *vt* présentent une baisse de l'expression du gène *Cdx1* suggérant que le gène *Wnt3a* soit nécessaire à l'expression du gène *Cdx1*. Ainsi, les transformations homéotiques observées chez les individus *vt* et qui corrélaient avec une expression altérée des gènes *Hox* pourraient être consécutive à la mauvaise expression du gène *Cdx1* (Section 1.2.2.1.2.3) ; (Ikeya et Takada, 2001). Des défauts de vertèbres caudales sont aussi observés chez les individus mutants pour la fonction *Wnt3a* suggérant une action directe de *Wnt3a* sur des gènes *Hox* plus postérieurs, ou encore une action indirecte via le gène *Cdx4*. De fait, l'expression ectopique de RA résulte en une baisse d'expression des gènes *Wnt3a* et *Cdx4* (Sakai et al., 2001; Abu-Abed et al., 2003). De plus, le mutant *vt* présente des défauts au niveau des vertèbres lombaires et sacrales qui ne sont pas observés chez les mutants *Cdx1* et *Cdx2*. Cette homéose pourrait être le résultat d'une baisse, entre autre, de l'expression du gène *Cdx4* (Ikeya et Takada, 2001; Pilon et al., 2006).

Plusieurs gènes *Hox* peuvent répondre le long de l'axe AP à une variété de facteurs signalétiques spécifiques plutôt qu'à un gradient d'informations fournit par un seul facteur. Dans ce processus, les protéines *Cdx* seraient des joueurs clés qui serviraient d'intermédiaires pour acheminer aux gènes *Hox* des signaux caudalisants de facteurs



extrinsèques tels que FGF, *Wnt* ou RA (figure 1.7). En effet, le gène *Cdx1* est directement régulé par *Wnt* et RA alors que les signalisations FGF et *Wnt* ont un impact potentiel sur l'expression des gènes *Cdx2* ou *Cdx4* (Pownall et al., 1996; Houle et al., 2000; Lickert et al., 2000; Ikeya et Takada, 2001; Prinos et al., 2001; Houle et al., 2003; Shimizu et al., 2005). Ainsi, l'expression du gène *Cdx1* serait induite par le RA généré dans la région de la PS à E7.5. À E8.5, quand la production de RA cesse dans le bourgeon de queue, l'expression du gène *Cdx1* est maintenue dans la partie caudale de l'embryon par la voie de signalisation *Wnt* et une boucle d'autorégulation. Pour atténuer l'expression ectopique de *Cdx1* dans le tronc, le RA induit l'expression des COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor) pour bloquer l'accès au RARE par compétition (figure 1.7). Ceci résulte en une restriction des transcrits du gène *Cdx1* dans la partie caudale de l'embryon. Ces transcrits *Cdx* contribuent à établir les domaines d'expression appropriés des gènes *Hox* et la spécification du squelette axial (Béland et al., 2004; Béland et Lohnes, 2005). De même, les gènes situés en 5' du complexe *HoxB* (gènes *Hoxb6* à *Hoxb9*) peuvent être activés ou induits par les FGF via les *Cdx* alors que ces gènes sont réfractaires au RA. Au contraire, les gènes situés en 3' du complexe (gènes *Hoxb1*, *Hoxb3* à *Hoxb5*) répondent au RA mais pas au FGF. Donc, tous les gènes du complexe *HoxB* seraient compétents pour répondre au FGF via les gènes *Cdx* mais ce serait le domaine d'expression spatiale des gènes *Cdx* qui empêcherait les gènes plus en 3' des complexes de répondre au FGF dans le cerveau postérieur. Ainsi chaque gène *Hox* devient activé lorsqu'il chevauche le domaine d'expression des gènes *Cdx*. Avec le temps, ce domaine devient plus postérieur et en conséquence les gènes *Hox* activés plus tardivement présentent une limite d'expression plus postérieure (Bel-Vialar et al., 2002). L'ensemble de ces données démontre le rôle central joué par les protéines Cdx dans les mécanismes de régulation des gènes *Hox*.

#### **1.2.2.1.2.5. Les co-facteurs Pbx/Meis**

Le facteur de transcription Pbx1 (Pre-B cell leukemia transcription factor 1) a été découvert en 1990 dans le cadre d'études de leucémies humaines associées avec des translocations chromosomiques faisant intervenir *PBX1* et qui résultent en une fusion avec le domaine d'activation transcriptionnelle du gène E2a (Kamps et al., 1990; Nourse et al.,

1990). La capacité de transformation de l'oncoprotéine de fusion E2aPbx1 résultante serait dépendante de sa capacité à interagir avec les protéines HOX (Slupsky et al., 2001). Depuis, trois autres membres de la famille ont été rapportés, soit Pbx2, Pbx3 et Pbx4 (Monica et al., 1991; Wagner et al., 2001). Les protéines Pbx sont des membres de la famille TALE (Section 1.2.1) et peuvent interagir avec les produits des gènes *Hox* par l'intermédiaire du domaine homéo et d'une région, située dans la partie aminoterminal et conservée chez les gènes des groupes paralogues 1 à 8, appelée penta/hexapeptide ou motif YPWM (Neuteboom et al., 1995; Shen et al., 1996; Di Rocco et al., 2001; Moens et Selleri, 2006). Ces interactions protéiques permettent de moduler l'affinité et la stabilité de la liaison à l'ADN pour contrôler l'activité des protéines Hox (Lufkin, 1996; Shen et al., 1997a). Des protéines TALE additionnelles, qui incluent les protéines MEIS et Prep, sont capables de lier les complexes Hox-Pbx. Les protéines Meis1, Meis 2 et Meis 3 (Burglin, 1997), possèdent un domaine N-terminal conservé par l'intermédiaire duquel elles lient les protéines Pbx (Knoepfler et al., 1997; Wagner et al., 2001). Le domaine homéo des protéines Hox reconnaît la séquence nucléotidique TNAT(G/T)(G/A) présente dans les gènes cibles qu'ils contrôlent. Toutefois, la spécificité d'action des protéines Hox provient en partie de leur interaction avec les co-facteurs Pbx et Meis. Ainsi, dans les cellules de leucémies myéloïdes, MEIS1 forme des complexes ternaires avec le dimère PBX-HOXA9 pour lier les séquences consensus PBX-HOXA9 pour augmenter la spécificité fonctionnelle des protéines Hox (Shen et al., 1999). Les protéines Pbx lient principalement les produits des gènes *Hox* des paralogues des groupes 1-10 (Shen et al., 1997b) alors que Meis lie préférentiellement les protéines Hox des groupes 9-13 (Shen et al., 1997a). Les protéines Meis présentent un domaine conservé au cours de l'évolution, le domaine Meinox, par l'intermédiaire duquel elles peuvent interagir avec les protéines Pbx pour permettre la formation de complexe ternaire Meis/Pbx/Hox (Berthelsen et al., 1998; Shen et al., 1999).

Des études *in vitro* démontrent que le produit du gène *Hoxb8* peut s'associer à Pbx1 et Pbx2 pour lier spécifiquement l'ADN (van Dijk et al., 1995). La mutation de deux résidus de l'hexapeptide se traduit par une perte de la liaison entre les protéines Pbx et Hoxb8 (Neuteboom et al., 1995). Chez les individus porteurs de cette mutation de l'hexapeptide, on observe des transformations homéotiques identiques à celles observées



chez les individus mutants pour la fonction des gènes *Hoxa7*, *Hoxb7* et *Hoxb9*. Il y a donc interférence avec l'activité des gènes des complexes *HoxA* et *HoxB* sans altérer leur expression. La protéine mutante *Hoxb8* interférerait avec la fonction des autres protéines *Hox* en liant leurs cibles (Medina-Martinez et Ramírez-Solis, 2003). Le même type d'étude, menée en mutant l'hexapeptide de la protéine *Hoxa1*, se traduit par l'observation de défauts similaires à ceux préalablement décrits pour la perte de fonction du gène *Hoxa1*. Toutefois, la mutation de l'hexapeptide de la protéine *Hoxa1* résulte en une perte de fonction du gène alors que celle de *Hoxb8* se traduit par un gain de fonction montrant ainsi que l'impact de l'interaction des protéines *Pbx*, bien qu'importante pour leur fonctionnalité, diffère selon les protéines *Hox* (Remacle et al., 2004).

#### **1.2.2.1.2.6. Autorégulation et régulation croisée**

Une fois correctement activée, l'expression des gènes *Hox* doit être maintenue. Cette tâche serait en partie réalisée par des mécanismes d'auto- et/ou de régulation croisée. Ce type de régulation a été décrite pour les gènes *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxb2*, *Hoxa3* et *Hoxb4* en association avec les co-facteurs *Pbx* et *Meis/Prep* (voir section précédente) ; (Pöpperl et al., 1995; Gould et al., 1997; Maconochie et al., 1997; Gould et al., 1998; Ferretti et al., 2000; Manzanares et al., 2001). Par exemple, le gène *Hoxa1* est requis pour positionner la limite antérieure du gène *Hoxb1* à la frontière présomptive entre les rhombomères r3/r4. Chez les mutants *Hoxa1*, l'impossibilité de définir cette frontière d'expression pour le gène *Hoxb1* entraîne une cascade d'expression erronée des gènes situés en aval et résulte en une mauvaise spécification des compartiments du cerveau postérieur de r2 à r5. L'expression du gène *Hoxb1* dans r4 dépend des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* puisque l'expression du gène *Hoxb1* est initiée dans r4 chez les mutants pour la fonction des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* mais pas chez le double mutant *Hoxa1<sup>-/-</sup>Hoxb1<sup>-/-</sup>* (Studer et al., 1998). Initialement, les gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* sont activés dans le tissu neural par le RA. La maintenance de l'expression du gène *Hoxb1* dans r4 est dépendante d'un élément d'autorégulation (ARE). Premièrement, la protéine *Hoxa1* se lie à l'élément d'autorégulation du gène *Hoxb1* en coopération avec des co-facteurs *Pbx*, et, par la suite, *Hoxb1* maintient sa propre expression (Pöpperl et al., 1995; Di Rocco et al., 2001). Ainsi, l'auto- et la para-régulation du gène *Hoxb1* sont dépendantes de la liaison des protéines *Hoxa1* et *Hoxb1* en association avec un

membre de la famille PBX sur trois séquences présentes dans l'ARE du gène *Hoxb1* (Pöpperl et al., 1995; Studer et al., 1996; Studer et al., 1998; Barrow et al., 2000; Di Rocco et al., 2001; Ferretti et al., 2005).

De façon similaire, une séquence activatrice, responsable de l'expression du gène *Hoxb2* dans r4 (élément r4), peut être transactivée *in vitro* par l'expression ectopique des gènes *Hoxb1*, *Hoxa1* et *labial*, mais pas par les gènes *Hoxb2* et *Hoxb4* montrant ainsi une spécificité de liaison pour les gènes *Hox* orthologues au gène *labial* de drosophile (Maconochie et al., 1997). La fonction de l'élément r4 du gène *Hoxb2* est de diriger l'expression du gène *Hoxb2* par la protéine Hoxb1 dans le rhombomère 4 où le gène *Hoxb1* est spécifiquement exprimé (Pöpperl et al., 1995; Maconochie et al., 1997). Les deux séquences régulatrices nécessaires à l'expression spécifique des gènes *Hoxb1* et *Hoxb2* dans r4 en réponse à Hoxb1 font intervenir un complexe ternaire avec les protéines Hoxb1, Pbx et Meis. Le rôle de Meis serait d'augmenter l'affinité du complexe hétérotrimérique. Cette hiérarchie fonctionnelle permet un mécanisme pour la synergie entre les gènes *Hoxa1*, *Hoxb1* et *Hoxb2* dans la spécification du territoire r4 et la formation des CCN dérivées de r4 (Gavalas et al., 1998; Studer et al., 1998).

Un élément régulateur du gène *Hoxb3* contient deux sites de liaison potentiels pour les protéines *Hox*. Par des études de mutagenèse, ces sites se sont avérés indispensables pour l'expression du gène dans le tube neural (Section 1.2.2.1.1). Ces sites peuvent être reconnus spécifiquement par les protéines Hoxb3 et Hoxb4 suggérant des mécanismes d'auto- et de régulation croisée pour l'établissement de l'expression du gène *Hoxb3* dans le cerveau postérieur jusqu'à la frontière r5/r6 ainsi que pour son expression dans le tube neural antérieur (Yau et al., 2002). L'expression du gène *Hoxa3* est également maintenue par des mécanismes d'auto- et de régulation croisée. En effet, une séquence activatrice du gène *Hoxa3* est responsable de la phase tardive de l'expression du gène (Section 1.2.2.1.1). Cette séquence contient deux sites qui peuvent être reconnus par des hétérodimères Hoxb3/Pbx1a, Hoxa3/Pbx1a et Hoxd3/Pbx1a et qui sont nécessaires à l'activité de cet élément régulateur (Manzanares et al., 2001). Par ailleurs, le gène *Hoxa2* est exprimé jusqu'à la frontière r1/r2 dans le tube neural ainsi que dans r3 et r4. Ainsi, le gène *Hoxa2*



est le seul à être exprimé dans  $r2$  sous le contrôle d'un élément régulateur sur lequel se lie le complexe ternaire *Hoxa2/Pbx1a/Meis1* (Lampe et al., 2004).

Les processus d'auto- ou de régulation croisée n'ont été rapportés que dans le cadre d'études sur la régulation des gènes *Hox* exprimés dans le cerveau postérieur. Ceci reflète surtout le fait que la régulation de ces gènes a été étudiée de façon plus intensive que celle des gènes situés plus en 5' des complexes. Toutefois, ce type de régulation pourrait également exister pour ces gènes et de ce fait participer au processus de suppression phénotypique appelé prévalence postérieure chez les vertébrés (Duboule et Morata, 1994).

#### ***1.2.2.1.2.7. La suppression phénotypique ou prévalence postérieure***

Le concept de suppression phénotypique provient de l'observation du fait que l'expression ectopique des gènes homéotiques de drosophile induit des changements phénotypiques mais seulement dans des parties antérieures à leur domaine normal d'expression. Par contre, aucun effet au niveau du domaine normal d'expression du gène n'est observé, de même que dans les parties postérieures à ce domaine d'expression où les gènes homéotiques plus postérieurs sont actifs (Section 1.3.2). Cette inactivation fonctionnelle a été appelée suppression phénotypique (Gonzalez-Reyes et Morata, 1990; Mann et Hogness, 1990). Chez les vertébrés, le concept de prévalence postérieure a été émis pour expliquer l'absence de phénotype au niveau du bourgeon de l'aile du poulet dans des conditions qui devaient réactiver l'expression de gène *Hox* plus antérieur (Duboule et Morata, 1994). Le traitement au RA, sensé réactiver l'expression des gènes n'a aucun effet mais on observe une duplication des structures quand des gènes plus postérieurs sont activés au site de traitement (Duboule, 1991). Ainsi, quand une protéine postérieure est exprimée ectopiquement dans des domaines plus antérieurs, ces domaines sont transformés et présentent des caractéristiques plus postérieures. Cependant, quand des gènes antérieurs sont exprimés dans des domaines plus postérieurs, aucune transformation d'antériorisation n'est observée au niveau du domaine d'expression ectopique.

Aucune démonstration moléculaire de cette prévalence postérieure n'a été rapportée. Toutefois, cet effet se produit sans changement dans le niveau d'expression des gènes *Hox* endogènes (Cribbs et al., 1995). Il a donc été postulé que la prévalence

postérieure, du gène *Hox* le plus postérieur exprimé à un niveau axial donné, pourrait être le reflet d'une gradation dans les efficacités de liaison des produits des gènes *Hox*. Par exemple, les produits de gènes *Hox* plus postérieurs pourraient lier plus efficacement certaines séquences cibles partagées entre plusieurs gènes *Hox*. Il pourrait également y avoir compétition pour l'interaction des protéines Hox avec des cofacteurs communs. De ce fait, un rôle central serait joué par le bras N-terminal et le résidu 13 du domaine homéo qui diffèrent entre les protéines Hox antérieures et postérieures. Ainsi, une protéine Hox postérieure, exprimée dans un domaine plus antérieur, pourrait compétitionner sur les sites de liaison des protéines Hox antérieures alors que la relation inverse ne peut se produire (LaRonde-LeBlanc et Wolberger, 2003). Le remplacement de la boîte homéo du gène *Hoxa11* par celle du gène *Hoxa13* entraîne, dans le système reproductif, l'acquisition d'une spécificité fonctionnelle dominante du nouvel allèle. Donc, la prévalence postérieure serait en partie médiée par la boîte homéo. Des études similaires avec le remplacement de la boîte homéo du gène *Hoxa11* par celle du gène *Hoxa4* ou *Hoxa10* suggèrent que des boîtes homéo de gènes *Hox* proches peuvent lier des groupes de cibles qui se chevauchent, mais avec une affinité différente, alors que des boîtes homéo plus divergentes lient des cibles plus distinctes (Zhao et Potter, 2002). Chez la souris, l'exemple de la mutation *ulnaless* résulte en une réduction du squelette du membre proximal qui pourrait soit être la résultante de la prévalence postérieure, soit une mauvaise expression des gènes *Hoxd13* et *Hoxd12*. En effet, une expression ectopique des deux gènes dans le zeugopode pourrait être accompagnée d'une répression transcriptionnelle et/ou fonctionnelle des gènes *Hox* du groupe paralogue 11 puisqu'on observe une réduction des transcrits *Hoxd10*, *Hoxd11* (Peichel et al., 1997). De plus, une expression du gène *Hoxd13* en lieu et place du gène *Hoxd11*, réalisée par transposition de gène, résulte dans un phénotype similaire suggérant une inactivation fonctionnelle des gènes du groupe paralogue 11 (van der Hoeven et al., 1996). Enfin, la restriction du gène *Hoxb1* à r4 est en partie exercée par la liaison de la protéine Hoxb3 sur une séquence régulatrice située en 3' du gène *Hoxb1* (Section 1.2.2.1.2.6). Cette liaison entraîne une répression de la transcription du gène *Hoxb1* dans r5 au stade E9.5. Bien que tous s'accordent sur le principe de prévalence postérieure, force est de constater que très peu est encore connu sur les mécanismes moléculaires

impliqués. La compréhension de tels mécanismes serait d'une grande utilité pour comprendre la régulation des gènes *Hox*.

#### **1.2.2.1.2.8. Les protéines *Pc* et *Trx***

Une fois établis, les domaines d'expression des gènes *Hox* doivent être maintenus. Comme chez la drosophile, les gènes des familles *Polycomb* (*PcG*) et *trithorax* (*Trx*) sont impliqués. Ainsi, chez les souris mutantes pour la fonction du gène *mll*, qui appartient à la famille *Trx*, l'expression du gène *Hoxa7* est établie normalement mais n'est pas maintenue (Yu et al., 1998). Au contraire, la double mutation des gènes *mel18* et *Bmi1*, deux gènes de la famille *PcG* et orthologues du gène *posterior sex combs* de drosophile, provoque une dérégulation de plusieurs gènes *Hox*, notamment les gènes *Hoxc6*, *Hoxb6* et *Hoxb3*, dans les régions antérieures de l'embryon (Akasaka et al., 2001). L'action répressive de la protéine *Bmi1* sur l'expression des gènes *Hox* se ferait par ubiquitynilation des histones H2A (Cao et al., 2005). Par ailleurs, la liaison de la protéine *mel18* est impliquée dans la répression de l'expression du gène *Hoxd4* en liant une séquence spécifique au niveau de la région promotrice du gène (Kobrossy et al., 2006). Enfin, une activation précoce du gène *Hoxd11* est observée chez les souris mutantes pour le gène *M33* qui est membre de la famille *PcG* (Bel-Vialar et al., 2000). Ainsi, certains gènes *PcG* doivent contrôler l'horloge d'activation des gènes *Hox* et contribuer au mécanisme de colinéarité. Ces données montrent que la transition entre une phase d'induction précoce des gènes *Hox* vers une phase tardive de maintenance nécessite l'action opposée des gènes activateurs de la famille *Trx* et l'action répressive des gènes de la famille *PcG* pour maintenir les domaines d'expression.

#### **1.2.2.2. Génération de transcrits multiples à partir des locus des gènes *Hox***

Malgré de nombreuses études, peu est encore connu concernant les bases moléculaires de la fonction des gènes *Hox*, en particulier concernant la pertinence physiologique des différentes isoformes produites par un gène donné au cours du développement. Un gène peut avoir plusieurs promoteurs. L'accessibilité de ces derniers peut être, entre autre, spécifique au tissu ou au stade développemental et permettre

l'initiation de différents transcrits. L'utilisation de promoteurs alternatifs a été observée pour plusieurs gènes et il est suggéré qu'une seule région promotrice n'est pas toujours suffisante pour accommoder toute l'information requise pour qu'un gène soit correctement exprimé dans le temps et l'espace (Ayoubi et Van De Ven, 1996). Ceci est particulièrement vrai pour des gènes comme les gènes *Hox* qui sont exprimés dans plus d'un tissu et/ou plusieurs stades développementaux. Ainsi, les gènes *Antp* et *AbdB* de drosophile possèdent différents promoteurs (Laughon et al., 1986; Zavortink et Sakonju, 1989). Chez la souris, les gènes du groupe paralogue 4 présentent, tous, deux promoteurs distincts (Galliot et al., 1989; Gutman et al., 1994; Folberg et al., 1997). Le gène *Hoxd4* possède deux promoteurs actifs et trois sites de polyadénylation alternatifs. La combinaison de ces éléments permet la génération de multiples transcrits. De plus, le promoteur le plus en amont dirige une expression plus postérieure que le promoteur situé plus en aval respectant ainsi la notion de colinéarité. Seul le promoteur en aval est actif pour le domaine d'expression antérieur du gène *Hoxd4* dans le cerveau postérieur suggérant une régulation différentielle des deux promoteurs. De même, les deux promoteurs répondent différemment à l'élément régulateur contenant un RARE lors d'une stimulation identique au RA. En effet, le promoteur situé en amont présente une réponse plus modérée et retardée comparée à celle du promoteur situé en aval qui, lui, réagit de façon comparable au promoteur du gène *Hoxb4* (Folberg et al., 1997). Ce dernier possède deux promoteurs actifs qui agissent indépendamment (figure 1.4) ; (Gutman et al., 1994). Pour sa part, le gène *Hoxc6* possède aussi deux promoteurs distincts qui génèrent chacun un transcrit particulier par épissage alternatif (Shimeld et al., 1993). Enfin, au moins quatre transcrits sont produits à partir du locus du gène *Hoxa5*. Ils sont générés à partir de deux promoteurs distincts et leur description sera présentée à la section 1.5 (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998).

Pour leur part, les gènes *Hoxa9* et *Hoxa10* génèrent plusieurs transcrits par utilisation d'un épissage alternatif (Benson et al., 1995; Fujimoto et al., 1998). Ainsi, le gène *Hoxa9* produit deux transcrits qui codent respectivement pour une protéine avec le domaine homéo (*Hoxa9*) et une où ce domaine est perdu (*Hoxa9T*). En effet, dans ce dernier cas, une partie de l'exon 1 est excisée lors de l'épissage provoquant un décalage du cadre de lecture qui entraîne l'apparition d'un codon stop en amont du domaine homéo (Fujimoto et al., 1998). Ces deux isoformes sont toutes deux co-exprimées pendant

l'embryogenèse et capables de lier le co-facteur CBP (CREB Binding Protein) suggérant, de ce fait, un rôle de compétition de la protéine Hoxa9T pour la liaison avec le co-facteur (Dintilhac et al., 2004). Les gènes *Hoxb3* et *Hoxb5* produisent également des transcrits alternatifs qui présentent des patrons d'expression spécifiques suggérant un rôle de régulation spatiale de l'expression de ces gènes (Krumlauf et al., 1987).

La régulation des gènes *Hox* peut également impliquer la production de transcrits non codants. Ainsi, il existe des transcrits antisens polyadénylés produits à partir du locus du gène *Hoxa11*. Dans les membres en développement, les transcrits antisens sont exprimés de façon conjointe avec les transcrits sens et pourraient former des duplex d'ARN double brins susceptibles d'être dégradés (Hsieh-Li et al., 1995). Ce phénomène est conservé pour le gène *HOXA11* humain suggérant une possible fonction régulatrice conservée au cours de l'évolution (Potter et Branford, 1998). La production de transcrits antisens a également été rapportée pour les gènes *Hoxb3* et *Hoxb5*. Pour le gène *Hoxb3*, ces transcrits antisens sont exprimés spécifiquement dans r4 et r6 (Hogan et al., 1988; Swiatek et Gridley, 1993).

Dans le mésoderme paraxial, la distribution des transcrits du gène *Hoxb4* est restreinte à la région localisée entre les somites 7 à 13 où est produite la protéine. Par contre, tous les transgènes étudiés présentent une expression postérieure au somite 13. La comparaison avec d'autres transgènes indique que le 3' UTR (UnTranslated Region) est nécessaire pour déstabiliser le transcrit dans la région somitique postérieure et, ainsi, restreindre l'expression du gène *Hoxb4* au domaine s7-13 (Whiting et al., 1991). Le gène *Hoxb4* serait donc transcrit dans tous les somites postérieurs à s6 et ce serait une régulation post-transcriptionnelle qui déterminerait la frontière postérieure du domaine d'expression. Dans le mésoderme paraxial, la détermination de la frontière antérieure d'un gène *Hox* donné pourrait être définie par l'initiation temporelle de son activation transcriptionnelle qui serait reliée à l'horloge de segmentation qui régule la somitogenèse (Dubrulle et al., 2001; Zákány et al., 2001). La transcription se ferait alors dans tous les somites postérieurs à ce point, et la frontière postérieure définitive serait déterminée en contrôlant la stabilité des transcrits dans la région postérieure par l'intermédiaire de séquences situées dans la région 3' UTR (Brend et al., 2003).

Récemment, des études ont montré l'implication des micros ARNs (miRNA) dans la régulation des gènes *Hox*. Les miRNAs forment une classe abondante d'ARN non codants. Ils sont établis dans le noyau à partir d'un transcrit primaire de 80 nucléotides (nt) ayant une forme d'épingle. Après exportation dans le cytoplasme, un miRNA de 22 nt est excisé. Ces miRNAs sont incorporés dans des complexes qui peuvent contrôler la traduction et la dégradation des ARNm. Deux familles de miRNAs sont présentes dans les complexes des gènes *Hox* des mammifères, soit la famille du miR-10 et celle du miR-196 (Tanzer et al., 2005). Le miRNA miR-10a cible spécifiquement la région 3' UTR du gène *Hoxb4* et pourrait, en partie, expliquer les observations de Brend et collaborateurs décrites précédemment puisqu'il est exprimé de façon caudale à la frontière postérieure du gène *Hoxb4*. Ce même miRNA est aussi retrouvé entre les gènes *Hoxd4* et *Hoxd8* (Pearson et al., 2005). Pour sa part miR-196a agit sur l'expression de plusieurs gènes en dégradant les ARNm du gène *Hoxb8* et en inhibant la transcription des gènes *Hoxc8*, *Hoxd8* et *Hoxa7* (Mansfield et al., 2004; Yekta et al., 2004). Ainsi, les miRNAs pourraient participer à la définition des domaines d'expression des gènes *Hox*, contribuant ainsi au contrôle spatial et temporel précis par lequel les gènes *Hox* contrôlent les processus développementaux (Pasquinelli et al., 2005).

### 1.2.2.3. Le principe de colinéarité

La conservation de l'organisation des gènes dans chaque complexe est associée à la conservation de leur expression spatio-temporelle durant l'embryogenèse (Krumlauf, 1994). Autrement dit, les gènes situés en 3' des complexes présentent une expression plus précoce et dans des domaines plus antérieurs que les gènes situés plus en 5'. Ceci indique une étroite correspondance entre l'arrangement chromosomal des gènes *Hox* et leur régulation dans le temps et l'espace. L'étude des mécanismes qui régissent cette relation de colinéarité des gènes *Hox* est principalement étayée par les études du groupe du Dr Duboule sur la mécanistique de la régulation de l'expression spatio-temporelle des gènes *Hox* du complexe *HoxD*. Le principe de colinéarité stipule que le moment de l'activation d'un gène serait responsable de la position de sa frontière d'expression antérieure. Il s'avère donc qu'une information temporelle doit être traduite en information spatiale. Toutefois, les frontières peuvent différer en fonction des différentes couches cellulaires tel que le tube



neural ou le mésoderme somitique, suggérant l'existence de plusieurs mécanismes qui agissent de concert. Ces mécanismes pourraient être de nature différente soit i) l'accessibilité transcriptionnelle progressive avec la présence de répresseurs ou « silencers » pouvant agir sur la structure chromatinienne (Kondo et Duboule, 1999). Pour ce faire, il existe une séquence décrite à la section 1.2.2.1.1.1, située entre les gènes *Hoxd12* et *Hoxd13*, douée de propriété de « silencer ». En effet, la délétion de cette séquence entraîne une expression ectopique des gènes *Hox* comme si le mécanisme de répression avait été aboli. De plus, la transcription des gènes *Hox* eux-mêmes pourrait aider à remodeler la chromatine. Les gènes activés de façon précoce pourraient recruter les facteurs nécessaires à l'activation chronologique des gènes (Kmita et al., 2000b) ; ii) une activation colinéaire, dans le temps et l'espace, orchestrée par des séquences régulatrices locales faisant intervenir un gradient de molécules signalisatrices comme FGF (Section 1.2.2.1.2.3) ; (Bel-Vialar et al., 2002) ; iii) la présence d'éléments régulateurs globaux localisés en dehors du complexe et qui peuvent réguler plusieurs gènes de façon indépendante du promoteur. Par exemple, la colinéarité dans les doigts est dépendante d'un élément régulateur spécifique localisé en aval du complexe D, dans une région de contrôle global (GCR) riche en séquences activatrices (décrit dans la section 1.2.2.1.1.1; figure 1.6) ; (Kmita et al., 2002a; Spitz et al., 2003). L'expression des gènes localisés en 5' du complexe *HoxD* dans les doigts est contrôlée par un élément global qui est localisé de façon centromérique par rapport au complexe. Cet élément régulateur contrôle le temps, la position spatiale et le niveau d'activité transcriptionnelle des gènes localisés en 5' du complexe *HoxD* (Spitz et al., 2001b; Kmita et al., 2002a; Zákány et al., 2004). En effet, cette région englobe un élément régulateur pour les doigts, qui montre un tropisme pour l'extrémité centromérique du complexe, expliquant que la régulation des promoteurs décroît respectivement pour les gènes *Hoxd13*, *Hoxd12*, *Hoxd11* et *Hoxd10*, procurant ainsi une base mécanistique pour une colinéarité de type quantitative. De plus, la colinéarité spatiale résulte d'une balance entre le moment de l'activation et la position par rapport aux éléments inhibiteurs localisés en 5' du complexe *HoxD* (Tarchini et Duboule, 2006). Une fonction importante de la colinéarité temporelle serait donc d'empêcher les gènes situés en 5' d'être exprimés trop tôt et dans des domaines trop antérieurs ce qui entraînerait des altérations dans le patron développemental (Kondo et al., 1998b).

Il a aussi été proposé que les complexes *Hox* soient initialement dans une configuration fermée empêchant leur transcription, et, que les complexes deviennent progressivement ouverts durant le développement. Cette ouverture des complexes relâcherait séquentiellement les gènes d'une influence répressive pour les rendre progressivement disponibles pour la transcription (Kondo et Duboule, 1999). Le mécanisme temporel qui contrôle l'étape d'ouverture des complexes et qui assure qu'un gène donné soit exprimé au niveau axial approprié est encore inconnu. Cependant, comme c'est le cas pour l'expression des gènes dans les membres, l'ouverture des complexes *Hox* dans le mésoderme paraxial pourrait être reliée au nombre de divisions cellulaires passées par les cellules souches dans la ligne primitive et le bourgeon de queue à partir desquels les tissus sont originaires (Dale et Pourquie, 2000; Dubrulle et al., 2001).

D'autre part, une autre étude, menée dans le but d'expliquer les mécanismes conduisant au phénomène de colinéarité, a révélé une relation entre la modification des histones et l'activation du gène *Hoxd4* (Rastegar et al., 2004). De même, il pourrait exister un lien moléculaire entre l'activation des gènes *Hox* et l'horloge de segmentation. Ainsi, pendant le développement, les gènes *Hox* sont activés dans le mésoderme pré-somitique (PSM) suivant une séquence chronologique correspondant à l'ordre des gènes dans le complexe. Ce mécanisme dépendrait de la voie de signalisation *Notch* puisque la mutation d'un effecteur de cette signalisation (*RBPJk*) se traduit par une réduction de l'expression des gènes du complexe *HoxD* dans le PSM. La voie de signalisation *Notch* activerait la transcription des gènes dans les cellules proches de la frontière somitique pour aider ces cellules à acquérir leur devenir morphologique. Ainsi, les cellules, atteignant la région où se forme le somite, répondraient à un signal local en activant les gènes *Hox* transcriptionnellement actifs pour permettre une coordination temporelle entre la formation des somites et l'activation des gènes *Hox* (Zákány et al., 2001). Par ailleurs, une étude récente utilisant des expériences de greffes de portion de PS surexprimant différents gènes *Hox* chez l'embryon de poulet suggère un lien entre l'ingression des cellules du mésoderme et l'activation colinéaire des gènes du complexe *HoxB*. En effet, les gènes du complexe *HoxB* sont activés séquentiellement dans les précurseurs épiblastiques qui bordent la PS. Cette activation séquentielle induit une ingression ordonnée des cellules épiblastiques dans



la PS qui serait une étape initiale à l'établissement des domaines d'expression spécifiques des gènes *Hox* dans le mésoderme (Iimura et Pourquié, 2006).

Enfin, le suivi de l'activation séquentielle des gènes *Hox*, dans des cellules ES ou dans un embryon en développement, a montré des modifications de la chromatine le long du complexe *HoxB* (Chambeyron et Bickmore, 2004). Ainsi, une courte exposition au RA, suffisante pour induire une décondensation générale des loci *HoxB* dans les cellules ES à un moment où seul le gène *Hoxb1* devrait être exprimé, entraîne l'observation d'une boucle sélective pour que le gène *Hoxb1* sorte du territoire chromosomique. Le même phénomène est observé dans la partie postérieure de la PS chez l'embryon où le gène *Hoxb1* commence à être exprimé au stade E6.5 (Chambeyron et al., 2005). Au même moment, le gène *Hoxb9* ne sort pas de son territoire chromosomique mais ne le fait que plus tardivement dans le tube neural postérieur au stade E9.5. Le même résultat est observé lorsque les cellules ES sont exposées de façon prolongée au RA. Enfin, dans les tissus du bourgeon caudal au stade E9.5, les deux gènes sont normalement exprimés et apparaissent exclus de leurs territoires chromosomiques. Ces données suggèrent que l'exclusion des gènes du territoire chromosomique est finement couplée à la transcription des gènes. L'extrusion du territoire chromosomique jouerait un rôle dans l'activation transcriptionnelle en localisant les gènes dans des sites subnucléaires associés avec des structures facilitant la transcription (Chambeyron et al., 2005). La décondensation de la chromatine ainsi que la ré-organisation nucléaire observée au niveau du complexe *HoxB* pendant la différenciation des cellules ES est reproduite chez l'embryon au moment de la formation de la PS et dans la spécification du tube neural. De plus, on observe une organisation nucléaire des gènes du complexe *HoxB* le long de l'axe AP du tube neural qui parallèle leur expression co-linéaire (Chambeyron et al., 2005).

#### **1.2.2.4. Les modifications post-traductionnelles des protéines Hox**

Par ailleurs, les protéines Hox peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui peuvent moduler l'action des protéines en modifiant leur structure tertiaire. Ainsi, les protéines Hox peuvent être phosphorylées. C'est le cas par exemple des protéines Hoxb5 et Hoxa5 (Odenwald et al., 1989 ; Wall et al., 1992). D'autre part, l'étude de la protéine

Hoxb7 dans des cellules de cancer de sein a permis de montrer que l'action d'un inhibiteur d'acétylation se traduit par une augmentation de l'activité transactivatrice de la protéine Hoxb7 suggérant soit une modification de la chromatine au niveau des sites de liaison de la protéine Hoxb7 pour faciliter l'accès de la protéine à l'ADN, soit un contrôle de sa fonction par acétylation comme décrit pour p53 (Gu et Roeder, 1997), ou encore l'acétylation d'un co-facteur nécessaire pour l'activité optimale de la protéine Hoxb7 (Chariot et al., 1999).

Comme cela vient d'être détaillé dans les sections précédentes, plusieurs mécanismes sont requis pour le contrôle de l'expression spatio-temporelle des gènes *Hox*. On retrouve l'utilisation de séquences régulatrices multiples qui peuvent, dans certains cas, être localisées à distance des complexes *Hox*, être partagées ou présenter une préférence pour certains promoteurs. Plusieurs facteurs agissent en *trans* sur ces séquences régulatrices, parmi lesquels on retrouve les membres de la famille des protéines Cdx ou les protéines *Hox* elle-mêmes. Ces mécanismes de régulation entraînent la génération de transcrits multiples à partir des différents locus des gènes *Hox* pour permettre d'offrir une plus grande flexibilité dans l'expression des gènes. Enfin, la réorganisation nucléaire serait un des mécanismes impliqués dans la régulation co-linéaire des gènes *Hox*. L'organisation sous forme de complexe compact pourrait être à l'origine du partage des séquences régulatrices et de la sélectivité. En contrepartie, ces mécanismes ont contraint les organismes à conserver cette organisation génomique au cours de l'évolution, nécessitant la mise en place de système de régulation additionnel comme les éléments de contrôle à distance. Par ces différents modes de régulation, les organismes veillent à ce que des gènes aussi vitaux que les gènes *Hox* soient exprimés adéquatement.

## **1.3. Etude de la fonction des gènes *Hox***

### **1.3.1. Implication des gènes *Hox* dans la spécification du squelette axial**

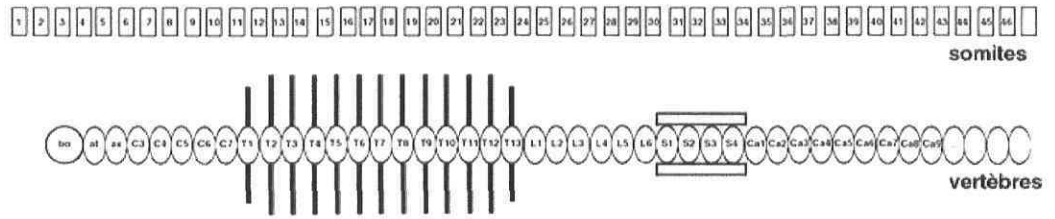
Chez les vertébrés, la colonne vertébrale est apparentée à une structure segmentée car elle dérive de structures transitoires appelées somites. Ces derniers sont également à l'origine des muscles striés et du derme dorsal. Chez la souris, le squelette est composé de 7 vertèbres cervicales (C), 13 vertèbres thoraciques (T), 6 vertèbres lombaires (L), 4

vertèbres sacrales (S) et d'une trentaine de vertèbres caudales (Ca) dont les 5 premières présentent des processus latéraux. Des approches génétiques ont montré que les gènes *Hox* de souris, exprimés pendant la somitogenèse, sont essentiels à la spécification de l'identité axiale. La première démonstration provient de l'étude de l'expression ectopique du gène *Hoxa7* qui se traduit par des malformations au niveau des vertèbres cervicales. Ainsi, la deuxième vertèbre cervicale acquiert l'identité d'une troisième vertèbre cervicale, démontrant ainsi une fonction homéotique des gènes *Hox* chez la souris (Kessel et al., 1990). La même approche, utilisée avec les gènes *Hoxb6*, *Hoxc6*, *Hoxb7*, *Hoxb8* et *Hoxc8*, a généré des résultats similaires, à savoir des transformations homéotiques de postériorisation dans les domaines d'expression ectopique (Jegalian et al., 1992; Kaur et al., 1992; McLain et al., 1992; Charité et al., 1994; Pollock et al., 1995).

L'analyse des souris déficientes pour une fonction *Hox* confirme que la fonction homéotique de ces gènes est conservée au cours de l'évolution. La majorité des gènes *Hox* a été mutée et les conséquences sur l'identité axiale décrites. Contrairement aux études de gain de fonction qui, comme chez la drosophile, se traduisent par des transformations de postériorisation, les transformations homéotiques décrites chez les souris porteuses d'un locus *Hox* muté sont majoritairement des transformations d'antériorisation. Dépendamment du domaine d'expression du gène *Hox* et des phénotypes observés le long de l'axe AP, on peut les classer en trois groupes : i) les gènes de la tête des groupes paralogues 1 à 4, ii) les gènes du tronc des groupes paralogues 5 à 8 et iii) les gènes caudaux des groupes paralogues 9 à 13. L'ensemble des transformations homéotiques du squelette axial, rapportées par les études de perte de fonction des gènes *Hox*, est présenté dans la figure 1.8.

#### **1.3.1.1. Les gènes *Hox* des groupes paralogues 1 à 4**

La mutation des gènes des groupes paralogues 1 et 2 et du gène *Hoxa3* se traduit par des malformations de la boîte crânienne qui correspond au domaine d'expression le plus antérieur de chacun de ces gènes (Lufkin et al., 1991; Chisaka et al., 1992; Gendron-Maguire et al., 1993; Rijli et al., 1993; Barrow et Capecci, 1996; Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996; Davenne et al., 1999). Chez les mutants *Hoxb3*, on retrouve notamment



- d3**
- a3/b3, a3/d3**
- a4**
- b4**
- d4**
- Hox4**
- a5**
- b5**
- Hox5**
- a6**
- b6**
- Hox6**
- b8**
- d8**
- c8**
- c8/d8**
- c8/b8, b8/d8, Hox8**
- a9**
- d9**
- a9/d9**
- a10**
- d10**
- a10/d10**
- Hox10**
- a11**
- d11**
- a11/d11**
- Hox11**
- a10/d11**
- d13**
- c13**



une altération de C1 et C2. Des transformations de C1 en os basi occipital et de C2 en C1 sont caractéristiques des mutants *Hoxd3* (Chisaka et Capecchi, 1991; Condie et Capecchi, 1993; Manley et Capecchi, 1997). Les mutations combinées *Hoxa3/Hoxd3* et *Hoxb3/Hoxd3* présentent une région atteinte qui est plus étendue avec une sévérité des phénotypes observés qui augmente avec le nombre d'allèles mutés suggérant une redondance fonctionnelle entre les membres d'un même groupe paralogue (Manley et Capecchi, 1997).

Le gène *Hoxa4* possède une frontière antérieure d'expression au niveau de la prévertèbre (pv) 1 alors qu'elle se situe au niveau de pv2 pour les autres gènes du groupe paralogue 4. Les souris *Hoxa4*<sup>-/-</sup> présentent une transformation de C3 en C2 et de C7 en T1 (Horan et al., 1994; Kostic et Capecchi, 1994). Cependant, la mutation du gène *Hoxa4* interfère avec l'expression du gène *Hoxa5* avoisinant, ce qui pourrait expliquer ce dernier phénotype commun aux deux gènes (Aubin et al., 1998). Les mutations *Hoxb4* et *Hoxd4* montrent une transformation de C2 en C1. De plus, les souris *Hoxb4*<sup>-/-</sup> meurent à la naissance d'une fission sternale (Ramírez-Solis et al., 1993). Deux mutants pour le gène *Hoxc4* ont été décrits et l'impact des mutations sur le squelette axial diffère. Ainsi, le remplacement d'une partie du gène par une cassette de sélection provoque une antériorisation de T3 en T2 et de T8 en T7 ainsi qu'une postériorisation de C7 en T1 (Saegusa et al., 1996). Lorsque l'insertion de la cassette de sélection a lieu dans la boîte homéo, on retrouve de nombreuses antériorisations entre T2 et T11 suggérant un impact de l'insertion sur les gènes *Hox* environnants (Boulet et Capecchi, 1996). Comme pour les mutants du groupe paralogue 3, la sévérité des phénotypes s'accroît avec la combinaison d'allèles présents. Ainsi, chez le triple mutant des gènes *Hoxa4/Hoxb4/Hoxd4*, les cervicales situées entre C2 et C5 se transforment toutes en C1 alors que seulement certaines le sont dans le cas des différentes combinaisons de mutants doubles (Horan et al., 1995a; Horan et al., 1995b).

En général, les phénotypes observés chez les mutants des gènes de la tête sont restreints à leur domaine d'expression le plus antérieur. Par contre, pour le gène *Hoxc4*, les transformations homéotiques sont observées au niveau de la région pv7-14 qui correspond au domaine d'expression la plus importante du gène (Boulet et Capecchi, 1996).

### 1.3.1.2. Les gènes *Hox* des groupes paralogues 5 à 8

Les gènes *Hoxa5* et *Hoxb5* présentent une frontière antérieure de leur domaine d'expression au niveau de pv3. Elle se situe au niveau de pv5 pour *Hoxc5*. La mutation du gène *Hoxa5* résulte en des transformations homéotiques dans la région cervico-thoracique entre pv3 et pv10, avec, notamment, une transformation de C6 en C5 et de C7 en T1 chez tous les individus mutants (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). La description détaillée des phénotypes squelettiques liés à la perte de fonction du gène *Hoxa5* sera présentée dans la section 1.5. Il est important de noter que le mutant *Hoxa5* est le premier mutant *Hox* décrit qui présente à la fois des transformations d'antériorisation (C6 en C5) et de postériorisation (C7 en T1) ; (Jeannotte et al., 1993). La mutation du gène *Hoxb5* entraîne une transformation d'antériorisation des vertèbres C6 à T1 et une antériorisation du positionnement de la ceinture scapulaire (Rancourt et al., 1995). La mutation du gène *Hoxc5* se traduit par un phénotype similaire à celui du gène *Hoxc4*. Cependant, il est difficile d'interpréter les données compte tenu de l'interférence transcriptionnelle de la mutation *Hoxc4* sur l'expression de *Hoxc5* (Boulet et Capecchi, 1996). La mutation des trois gènes du groupe paralogue 5 résulte en des transformations homéotiques d'antériorisation des vertèbres C3 à T2 avec des transformations de C3 à T1 en C2 (McIntyre et al., soumis).

Le groupe paralogue 6 est constitué de 3 membres soit *Hoxa6* (frontière rostrale à pv9), *Hoxb6* et *Hoxc6* (frontière rostrale à pv7). Les souris mutantes pour la fonction *Hoxa6* présentent une postériorisation de C7 en T1 et de T1 en T2 (Kostic et Capecchi, 1994). La transformation C7 en T1 intervient en dehors du domaine d'expression du gène *Hoxa6*. Comme cette transformation est présente chez tous les individus *Hoxa5<sup>-/-</sup>*, ces données suggèrent une interférence de la mutation du gène *Hoxa6* sur celle du gène *Hoxa5*. La mutation du gène *Hoxb6* est semblable à celle du gène *Hoxb5* avec les transformations de T1 en C7, C7 en C6 et C6 en C5 (Rancourt et al., 1995). La mutation conjointe des trois gènes du groupe paralogue 6 provoque des transformations homéotiques confinées à la région située entre C7 et T6. Ainsi, les vertèbres T1 à T3 acquièrent des caractéristiques de vertèbres cervicales (McIntyre et al., soumis). De plus, des phénotypes différents sont observés chez les mutants des groupes paralogues 5 et 6 dans la région où leur expression

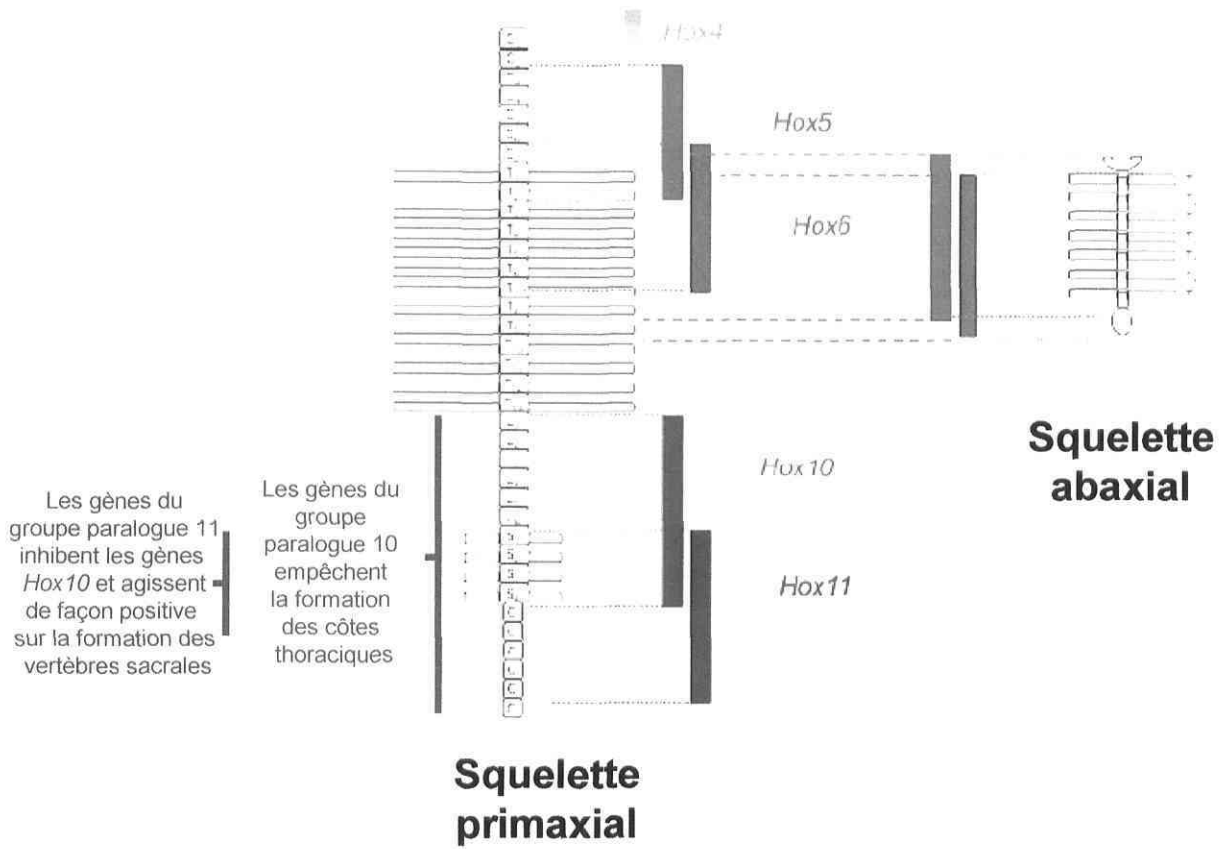
est conjointe suggérant des fonctions indépendantes de ces groupes paralogues pour la spécification des vertèbres situées entre C7 et T2 (figure 1.9).

Les gènes *Hox* du tronc sont exprimés dans la partie thoracique du squelette axial. Or, contrairement au reste du squelette, la région thoracique contient le sternum et les côtes sternales (squelette abaxial) qui dérivent, des somites et du mésoderme de la plaque latérale (Nowicki et Burke, 2000). Chez les mutants des groupes paralogues 5 (*Hox5*) et 6 (*Hox6*), on retrouve des anomalies au niveau du squelette abaxial caractérisées par un défaut de formation du sternum. Les mutants combinés *Hox5* présentent des sterni plus courts dont la première sternèbre est manquante et où le processus xiphoïde est non fusionné. Chez les individus *Hox6*, le phénotype est plus important avec un sternum altéré en plus d'être raccourci. De plus, le processus xiphoïde est absent et on retrouve de nombreuses fusions costales. Dans chaque combinaison de mutants multiples présentant 5 allèles mutants pour chacun des groupes paralogues 5 et 6, le phénotype observé est moins sévère que lorsque tous les allèles sont mutés démontrant un haut degré de redondance fonctionnelle (McIntyre et al., soumis).

Les souris mutantes pour le gène *Hoxb7*, exprimé jusqu'à pv11/12, présentent des malformations du sternum lorsqu'il est muté (Burke et al., 1995). Les individus mutants pour le gène *Hoxa7* (exprimé jusqu'à pv10) ne présentent aucune anomalie du squelette axial (Chen et al., 1998). Toutefois, la mutation conjointe des gènes *Hoxa7* et *Hoxb7* résulte en un phénotype *Hoxb7* amplifié suggérant une redondance fonctionnelle entre les deux gènes (Chen et al., 1998). On retrouve, comme pour les autres groupes paralogues, une augmentation de la pénétrance des phénotypes proportionnellement au nombre d'allèles mutants présents.

Les gènes *Hoxb8*, *Hoxc8* et *Hoxd8* s'expriment jusqu'à pv7, pv8 et pv18, respectivement (Izpisúa-Belmonte et al., 1990; Deschamps et Wijgerde, 1993; Tiret et al., 1993). La mutation du gène *Hoxd8* entraîne l'attachement d'une paire de côtes supplémentaire au sternum soit une transformation de T8 en T7 ainsi que le développement d'une côte rudimentaire sur L1, la transformant en T13 (van den Akker et al., 2001). Ces mêmes transformations sont retrouvées avec une plus grande pénétrance chez le mutant







*Hoxc8* qui présente, en plus, une transformation de T7 en T6 (Le Mouellic et al., 1992; Tìret et al., 1993; van den Akker et al., 2001). La mutation du gène *Hoxb8* se traduit par des défauts de formation du sternum. La mutation du gène *Hoxa8* ou *Hoxc8* associée à celle de *Hoxb8* se traduit par une diminution de la pénétrance des transformations T8 en T7 et L1 en T13. Par contre, il y a augmentation de la pénétrance du phénotype de transformation de T1 et T2 normalement observée chez le mutant *Hoxb8* (van den Akker et al., 2001). La distinction entre les squelettes primaxial et abaxial est peut être à l'origine de la difficulté d'interprétation des phénotypes squelettiques au niveau thoracique des mutants des groupes paralogues 7 et 8. Une étude des squelettes de ces individus comme celle menée sur les mutants *Hox5* et *Hox6* pourrait être un moyen de clarifier la fonction de ces gènes dans la spécification du squelette.

### 1.3.1.3. Les gènes *Hox* des groupes paralogues 9 à 13

Le gène *Hoxa9* est exprimé de l'extrémité caudale jusqu'à pv14 et les transformations du squelette sont situées dans la région où le gène est le plus fortement exprimé. On retrouve une malformation du sternum ainsi qu'une antériorisation des vertèbres entre L1 et L5 (Fromental-Ramain et al., 1996a). Le gène *Hoxb9* est exprimé jusqu'à pv10 et l'abolition de sa fonction provoque l'apparition d'anomalies sternales et costales (Chen et Capecchi, 1997). La mutation du gène *Hoxc9* (exprimé jusqu'à pv16) résulte en une antériorisation des vertèbres situées entre T10 et L1 (Suemori, 1995). Enfin, la mutation du gène *Hoxd9* (normalement exprimé jusqu'à pv20) se traduit par des transformations d'antériorisation des vertèbres L3 à L5 et S2 à Ca1 (Fromental-Ramain et al., 1996a). À nouveau, l'étude de mutants combinés montre le synergisme d'action des gènes d'un même groupe paralogue dans la spécification axiale puisque la pénétrance des phénotypes est proportionnelle à l'augmentation du nombre d'allèles mutés (Fromental-Ramain et al., 1996a; Chen et Capecchi, 1997). Enfin, chez les mutants du groupe paralogue 9 (*Hox9*), des transformations d'antériorisation de T8 à L4 en T7 ainsi qu'un attachement des côtes de T7 à T13 au sternum a été rapporté (McIntyre et al., soumis).

De part leur place au sein des complexes, les membres du groupe paralogue 10 spécifient la région lombo-sacrée. Le gène *Hoxa10* est exprimé jusqu'à pv20 et sa

mutation provoque une antériorisation de L1, L2, S1 et S2 ainsi qu'une postériorisation des vertèbres T3 à T12. Ces dernières sont inattendues car localisées dans un domaine plus antérieur à l'expression du gène. L'insertion de la cassette de sélection en serait la cause car elle interférerait avec les gènes avoisinants (Rijli et al., 1995). D'ailleurs, un autre mutant *Hoxa10* présente un phénotype moins marqué avec des transformations de L1 en T13 et des malformations des vertèbres S1 à S4 (Satokata et Uchiyama, 1995). La mutation du gène *Hoxd10* entraîne une antériorisation des vertèbres S1 à Ca1 (Carpenter et al., 1997). La même mutation, générée par Rijli et coll. (1994), en utilisant un promoteur différent pour diriger l'expression de la cassette de sélection, résulte en une mortalité périnatale ainsi qu'en de nombreuses malformations crâno-faciales et axiales. Une interférence transcriptionnelle de la cassette de sélection avec d'autres gènes du complexe serait à l'origine du phénotype observé. Chez les individus doubles mutants pour les gènes *Hoxa10/Hoxd10*, la transformation L1 en T13 est observée chez tous les individus, de même que des transformations de vertèbres plus postérieures (Wahba et al., 2001). Bien que la mutation du gène *Hoxc10* ne produise pas de transformation notable (Suemori et Noguchi, 2000), la mutation des trois gènes du groupe paralogue 10 (*Hox10*) résulte en une perte complète des vertèbres lombaires et sacrales qui sont transformées en vertèbres thoraciques porteuses de côtes. Quelque soit la combinaison de 5 allèles mutants du groupe paralogue 10, les phénotypes observés sont similaires et moins sévères que la mutation des 6 allèles *Hox10*, indiquant une contribution égale de chacun des gènes dans la spécification axiale (Wellik et Capecchi, 2003). Ainsi, il est postulé que les gènes *Hox* du groupe paralogue 10 agissent comme répresseur de la formation de côtes thoraciques dans la partie lombaire, expliquant la présence de côtes sur ces vertèbres chez les mutants *Hox10* (figure 1.9). De plus, l'expression ectopique de *Hoxa10* résulte en une répression de la formation des côtes dans la région d'expression ectopique (Carapuco et al., 2005).

Chez les souris *Hoxa11* mutantes, on retrouve une postériorisation de T13 en L1 et une antériorisation de S1 en L6 (Hogan et al., 1988). Une antériorisation des vertèbres S2 à Ca1 est une conséquence de la perte de fonction du gène *Hoxd11* (Izpisúa-Belmonte et al., 1991). Comme c'est souvent le cas, la mutation combinée *Hoxa11/Hoxd11* se caractérise par des phénotypes plus exacerbés avec S1 et S2 transformées en L6 (Davis et al., 1995). De plus, la perte d'un allèle du gène *Hoxa10*, combinée à la mutation du gène *Hoxd11*,

présente les mêmes transformations que la mutation *Hoxd11* mais avec une pénétrance plus importante. Cette double mutation provoque une antériorisation de toute la région lombaire montrant un synergisme entre ces deux gènes (Favier et al., 1996). Chez les mutants des trois gènes du groupe paralogue (*Hox11*), aucune vertèbre sacrale n'est retrouvée car elles se trouvent transformées en vertèbres de type lombaire. On retrouve également un défaut de la morphologie pelvienne (Wellik et Capecchi, 2003). Les membres du groupe paralogue 11 agiraient comme répresseurs de l'effet négatif des gènes du groupe paralogue 10 sur la formation des côtes afin de permettre la formation adéquate des vertèbres sacrales (figure 1.9).

Le gène *Hoxd12* est exprimé jusqu'à pv30 et aucun effet de la mutation n'a été rapporté concernant la spécification du squelette axial (Davis et Capecchi, 1996). Parmi les gènes du groupe paralogue 13, la mutation du gène *Hoxa13* est létale pendant le développement embryonnaire et donc aucune étude du squelette axial n'a été entreprise (Fromental-Ramain et al., 1996b). La mutation du gène *Hoxc13* montre une antériorisation des vertèbres entre Ca5 et Ca10 alors que la mutation du gène *Hoxd13* présente une antériorisation des vertèbres S4 à Ca3 (Dollé et al., 1993a; Godwin et Capecchi, 1998).

Il est maintenant clairement établi que les gènes paralogues peuvent avoir des fonctions redondantes. Ainsi, les mutations multiples au sein d'un groupe paralogue résultent le plus souvent en des phénotypes plus sévères que ceux causés par les mutations simples (Davis et al., 1995; Horan et al., 1995b; Chen et Capecchi, 1999; Wellik et Capecchi, 2003; McIntyre et al., soumis). La figure 1.9, qui indique les régions affectées chez les mutants *Hox4*, *Hox5*, *Hox6*, *Hox10* et *Hox11*, montre que ces transformations obéissent au principe de colinéarité puisque les gènes situés les plus en 3' affectent des structures plus antérieures que les gènes situés plus en 5'. Toutefois, chacun des phénotypes décrits pour une mutation d'un gène pourrait être modifié par les gènes avoisinants du même complexe. En effet, la délétion de séquences géniques pendant le ciblage de la mutation pourrait conduire à la perte d'éléments de contrôle des gènes adjacents. Ainsi, le phénotype d'une mutation individuelle pourrait être le résultat combiné de la perte du gène et de l'expression altérée des gènes voisins. Afin de clarifier le rôle spécifique de chacun des complexes, des souris porteuses de délétion complète de complexes ont été générées.

La délétion de tous les membres du complexe B (*HoxB*), excepté le gène *Hoxb13*, se traduit par l'obtention d'individus homozygotes qui meurent à la naissance en présentant un corps de forme arrondie. Cette mortalité est associée à des difficultés respiratoires. L'étude du squelette axial chez les mutants *HoxB* montre des transformations équivalentes à la somme des pertes des fonctions associées aux gènes *Hoxb5*, *Hoxb6* et *Hoxb8* (figure 1.8). La redondance des fonctions des gènes présents dans les autres complexes pourrait expliquer le faible effet observé chez le mutant *HoxB* (Medina-Martinez et al., 2000). La délétion du complexe C (*HoxC*) provoque également une mortalité périnatale qui est attribuable à un problème respiratoire. Le squelette axial et les membres postérieurs ne présentent aucune anomalie, pas même celles décrites chez les mutants simples. Le complexe *HoxC* ne semble donc pas essentiel pour la formation du squelette, et en son absence, les gènes *Hox* restants sont capables de compenser la mutation (Suemori et Noguchi, 2000). La délétion du complexe D (*HoxD*) et son remplacement par un gène rapporteur montre un effet qui correspond à une combinaison des phénotypes observés chez les mutants simples et qui est comparable à la délétion des gènes *Hoxd4* à *Hoxd13*. La délétion du complexe D provoque une fusion de C1 et C2 ainsi qu'une postériorisation de la transition lombo-sacrée avec sept vertèbres lombaires au lieu de six. Ainsi, l'altération est renforcée et plus pénétrante démontrant une redondance fonctionnelle des gènes du complexe *HoxD* pendant la morphogenèse vertébrale (Zákány et Duboule, 1999b; Spitz et al., 2001b). Toutefois, comme pour la mutation *HoxB* et *HoxC*, le complexe *HoxD* ne semble pas essentiel au processus de segmentation primaire. La possibilité d'une compensation par les autres complexes demeure tant que des mutations conjointes de complexes ne seront pas réalisées (Medina-Martinez et al., 2000; Suemori et Noguchi, 2000; Zákány et al., 2001). Comme la mutation du gène *Hoxa13* est embryonnaire létale, un mutant conditionnel du complexe A (*HoxA*) a été généré et utilisé pour étudier l'impact de la délétion du complexe *HoxA* dans le développement des membres. Toutefois, aucune étude du squelette axial n'a été entreprise (Kmita et al., 2005).

Les études de perte de fonction confirment que les gènes *Hox* de souris sont essentiels à la spécification de l'identité axiale. Ainsi, les mutations des gènes *Hox* entraînent majoritairement des transformations homéotiques d'antériorisation des vertèbres. Ces études révèlent également que ces transformations apparaissent le plus fréquemment

dans la partie antérieure du domaine d'expression des gènes *Hox*. Cette dernière observation est en accord avec le concept de prévalence postérieure décrit à la section 1.2.2.1.2.7. Enfin, l'étude de mutations combinées des gènes *Hox* révèle une grande redondance fonctionnelle entre les gènes d'un même groupe paralogue qui doit être un héritage fonctionnel du complexe homéotique ancestral.

## **1.3.2. Implication des gènes *Hox* dans les processus d'organogenèse**

Chez les vertébrés, la relation de colinéarité existant entre l'organisation chromosomique des gènes *Hox* et leur profil d'expression ne se limite pas à la colonne vertébrale. On la retrouve également dans le tube neural, la crête neurale, le rhombencéphale, l'ectoderme de surface, les arcs branchiaux, les systèmes digestif, respiratoire et urogénital ainsi que dans les membres (Krumlauf, 1994; Aubin et Jeannotte, 2001). Bien que les premières études concernant la mutation des gènes *Hox* se soient focalisées sur les conséquences au niveau de la spécification du squelette axial, il n'en demeure pas moins que bon nombre de ces mutations ont des répercussions sur la viabilité et l'organogenèse des souris. De fait, seules les mortalités associées aux mutations des gènes *Hoxd3* (dislocation cervicale) et *Hoxb4* (fissure sternale) sont explicables par les transformations squelettiques observées.

### **1.3.2.1. Gènes *Hox* et système nerveux central et crête neurale**

Les gènes des groupes paralogues 1 à 4 sont impliqués dans l'établissement du SNC et des dérivés des CCN (Lufkin, 1996; Lumsden et Krumlauf, 1996). Le tube neural donne naissance à l'ébauche des cerveaux antérieur, médian et postérieur. Pour leur part, les CCN proviennent du niveau dorsal du tube neural en développement et peuvent migrer dans différentes régions de l'embryon où elles se différencient en une variété de types cellulaires pour contribuer à l'ontogenèse de plusieurs organes et structures (Santagati et Rijli, 2003).

Les anomalies observées chez les mutants *Hoxa1* sont confinées au domaine antérieur d'expression, soit une désorganisation de la région r4-r7, provoquant une mortalité périnatale associée à une anoxie. Celle-ci semble liée à l'absence de structures

importantes pour le contrôle respiratoire comme le noyau moteur du nerf facial, le noyau moteur du nerf vague et le nerf glosso-pharyngien. Les mutants *Hoxa1* présentent également un retard dans la fermeture du tube neural à E9.5 et la partie basale de l'os occipital et l'oreille interne sont altérées (Lufkin et al., 1991; Chisaka et al., 1992; Carpenter et al., 1993; Dollé et al., 1993b; Mark et al., 1993). Plusieurs mutations du gène *Hoxb1* ont été rapportées (Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996; Gavalas et al., 1998; Studer et al., 1998). Les seules anomalies détectées concernent un problème de formation des composants somatiques moteurs du nerf facial, ainsi qu'un défaut dans la musculature faciale, entraînant une paralysie faciale. *Hoxb1* est exprimé spécifiquement dans r4 où il caractériserait et contrôlerait la migration des précurseurs des neurones moteurs faciaux (Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996; Bell et al., 1999; Gaufo et al., 2000). Dans le cas de la mutation double des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1*, on retrouve une perte du deuxième arc branchial et de ses tissus dérivés (Studer et al., 1998; Rossel et Capecchi, 1999). Enfin, chez Xénope, la mutation de l'ensemble des gènes du groupe paralogue 1 cause un phénotype sur la spécification du cerveau postérieur plus sévère que celui observé avec les mutations simples ou doubles. Le cerveau postérieur est alors réduit et présente une perte de la spécification des rhombomères 2 à 7 (McNulty et al., 2005).

Chez les individus porteurs d'une mutation du gène *Hoxa2*, les dérivés du deuxième arc branchial prennent l'identité de ceux dérivant du premier arc branchial, entraînant une duplication de l'oreille moyenne (Gendron-Maguire et al., 1993; Rijli et al., 1993). On retrouve également un défaut de segmentation caractérisé par une altération des tracés axonaux au stade E10.5. De plus, r1 est plus large, r2 et r3 sont plus petits et r2 acquiert des caractéristiques de r1 (Gavalas et al., 1997). Enfin, l'expression ectopique de *Hoxa2* dans r1 provoque une acquisition des caractéristiques de neurones moteurs issus de r2 ou r4 (Bell et al., 1999; Jungbluth et al., 1999). La mutation conditionnelle du gène *Hoxa2*, après la migration des CCN dans le deuxième arc branchial, reproduit le phénotype décrit chez le mutant conventionnel démontrant que les CCN nécessitent la fonction du gène *Hoxa2* pour compléter leur programme morphogénétique (Santagati et al., 2005).

Pour leur part, les gènes du groupe paralogue 3 influencent l'identité neuronale. Dans r6, les gènes *Hox3* sont requis pour supprimer l'expression du gène *Hoxb1*. En effet,



la mutation des gènes du groupe paralogue 3 résulte en une expression ectopique du gène *Hoxb1* dans r6 qui se traduit par une différenciation en motoneurons généralement obtenus à partir de r4. Dans la partie ventrale de r5, *Hoxa3* et *Hoxb3* sont nécessaires pour la spécification des progéniteurs de neurones moteurs. Ainsi, l'activité coordonnée des gènes *Hox3* le long de l'axe AP est requise pour l'établissement de l'identité de r5 et r6 (Manley et Capecchi, 1997; Gaufo et al., 2003). Généralement, les défauts du tube neural sont associés aux gènes *Hox* des groupes paralogues 1 à 3. Les autres gènes en présentent rarement. Toutefois, des études récentes montrent une fonction du gène *Hoxa5* au niveau du SNC. Ainsi, la génération d'une souris transgénique, qui exprime ectopiquement le gène *Hoxa5* dans la région dorsale du tube neural à mi-gestation montre une déficience structurale de la région cervicale du tube neural, une différenciation altérée, une migration et une apoptose indépendante de *p53* des neurones de la corne dorsale superficielle. Une expression aberrante du gène *BRN3A*, un facteur de transcription qui marque les neurones dans la partie ventrale du cerveau postérieur, est une autre conséquence observée (Krieger et al., 2004; Abbott et al., 2005).

Les mutations des gènes *Hoxb8*, *Hoxc8*, *Hoxa10* et *Hoxd10* produisent des altérations dans le développement et/ou la projection des neurones moteurs. Chez les individus *Hoxc8*<sup>-/-</sup>, les muscles des membres postérieurs sont innervés par des neurones moteurs surnuméraires provenant des segments spinaux C5-C6 et T1 (Tiret et al., 1998). En présence d'un gain de fonction du gène *Hoxb8*, sous contrôle du promoteur *RARβ2*, on observe la présence d'un ganglion spinal surnuméraire, nommé le ganglion de Frioriep. Ce dernier dégénère normalement à E10.5 suggérant un effet anti-apoptotique du gène *Hoxb8* dans les cellules du ganglion (Charité et al., 1994). L'inactivation du gène *Hoxa10* produit une transformation antérieure du nerf spinal lombaire et celle du gène *Hoxd10*, une altération de l'identité du segment spinal de la troisième lombaire (Rijli et al., 1995; Carpenter et al., 1997; Tarchini et Duboule, 2006). La mutation conjointe des gènes *Hoxa10* et *Hoxd10* se traduit par une réduction significative de l'innervation périphérique dérivée du nerf tibial ainsi qu'en une suppression de plusieurs ramifications postérieures du nerf sciatique (Wahba et al., 2001). Ces altérations semblent provenir d'une perte de neurones moteurs et/ou de l'identité de plusieurs segments spinaux lombaires. Une fois encore, les phénotypes observés chez les doubles mutants s'avèrent être une combinaison



des phénotypes observés chez les mutants simples et suggèrent un effet de synergisme entre les gènes d'un même groupe paralogue. De ce fait, l'information de spécification régionale, requise pour établir les différents domaines du système nerveux en développement, semble dérivée d'une activité coordonnée des gènes paralogues (Carpenter, 2002). Enfin, la délétion *HoxB* affecte la morphologie du nerf crânien suggérant une sommation des phénotypes individuels décrits chez les mutants *Hoxb1* à *Hoxb4* (Medina-Martinez et al., 2000). Aucune altération du système nerveux consécutive à la délétion des complexes *HoxA*, *HoxC* et *HoxD* n'a été rapportée (Suemori et Noguchi, 2000; Spitz et al., 2001b; Kmita et al., 2005).

### 1.3.2.2. Gènes *Hox* et morphogenèse des organes glandulaires

L'invalidation de certains gènes *Hox* a révélé leur participation dans la formation des structures osseuses, cartilagineuses et glandulaires. Ainsi, une absence de thymus et de glande parathyroïde est observée chez les doubles mutants *Hoxa1/Hoxb1* suggérant un problème de spécification du troisième arc branchial dont elles dérivent (Rossel et Capecchi, 1999). La mutation du gène *Hoxa3* est létale à cause d'anomalies cardiovasculaires et de malformations des os et des cartilages du cou. Les souris *Hoxa3*<sup>-/-</sup> sont dépourvues de thymus, de glande parathyroïde et présentent une réduction de la glande thyroïde ainsi qu'un déplacement de l'isthme thyroïdien (Chisaka et Capecchi, 1991; Manley et Capecchi, 1995). L'analyse des mutants composés du groupe paralogue 3, montre un synergisme sur la migration des cellules précurseurs de ces différents organes. Toutefois, de par son expression exclusive dans les troisième et quatrième poches pharyngiales, le gène *Hoxa3* semble jouer un rôle prépondérant comparé aux autres gènes du groupe paralogue 3 (Manley et Capecchi, 1997; Manley et Capecchi, 1998). La mutation du gène *Hoxa5* montre également l'implication du gène dans la fonction de la glande thyroïde. Brièvement, les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> présentent une hypothyroïdie et une désorganisation des follicules thyroïdiens qui sera présentée à la section 1.5.3.4 (Meunier et al., 2003).

### 1.3.2.3. Gènes *Hox* et le système respiratoire

Les études de perte de fonction des gènes *Hox* ont révélé leur implication lors de l'ontogenèse du système respiratoire. Ainsi, plusieurs des gènes *Hox* des groupes 1 à 6 sont exprimés pendant le développement du système respiratoire. Tout comme pour le squelette axial, leur implication sur le modelage proximodistal est dépendant de leur position le long des complexes (Cardoso, 1995). Tel que mentionné, les individus *Hoxa1*<sup>-/-</sup> meurent à la naissance à cause d'une anoxie. Toutefois, cette dernière n'est pas associée à des défauts d'ontogenèse du système respiratoire mais à une altération des centres de contrôle respiratoire dans le tronc cérébral (Section 1.3.2.1). Pour leur part, les individus *Hoxa1*<sup>-/-</sup>/*Hoxb1*<sup>-/-</sup> présentent des poumons qui sont plus petits avec un nombre réduit de lobes. Toutefois, l'histologie pulmonaire apparaît normale (Rossel et Capecchi, 1999). L'inactivation du gène *Hoxa3* provoque une malformation des os et des cartilages de la mâchoire et du larynx, notamment le cartilage thyroïdien (Manley et Capecchi, 1998). Le gène *Hoxa5* aurait un rôle complémentaire au niveau du larynx puisque la formation du cartilage cricoïdien est affectée. Jusqu'à présent, seule la mutation du gène *Hoxa5* entraîne une mortalité périnatale attribuable à une dysmorphogénèse du système respiratoire qui sera présentée à la section 1.5.3.2.1 (Aubin et al., 1997). Le gène *Hoxb5* est également exprimé au niveau pulmonaire, où il jouerait un rôle dans la spécification des ramifications aériennes pendant la morphogénèse pulmonaire ainsi que dans la spécification bronchiolaire (Volpe et al., 1997; Volpe et al., 2000a; Volpe et al., 2000b; Volpe et al., 2003). Aucune altération pulmonaire n'a été rapportée pour les autres gènes *Hox*, suggérant un rôle prépondérant du gène *Hoxa5* dans l'ontogenèse pulmonaire, ainsi qu'une possible redondance fonctionnelle des différents membres des groupes paralogues. Enfin, la délétion des complexes *HoxB* et *HoxC* est caractérisée par une mortalité périnatale associée à une détresse respiratoire. Malheureusement aucune étude approfondie n'a été rapportée concernant la caractérisation du phénotype respiratoire associé à ces mutations (Medina-Martinez et al., 2000; Suemori et Noguchi, 2000).

### 1.3.2.4. Gènes *Hox* et le système digestif

La mutation des gènes homéotiques chez la drosophile peut modifier la constriction des muscles dans le mésoderme de l'intestin moyen, indiquant un rôle ancestral des gènes

*Hox* dans l'assignation des spécificités le long du système digestif primitif (Bienz, 1994). En effet, l'inactivation de plusieurs gènes *Hox* indique qu'ils sont impliqués dans la spécification régionale du tube digestif chez la souris. Ainsi, la mutation du gène *Hoxc4* se traduit par une malformation de l'œsophage qui serait à l'origine de la mortalité observée dans les jours suivant la naissance. Une malformation de la couche musculaire entraînerait un défaut de nutrition des nouveau-nés (Boulet et Capecchi, 1996). Pour sa part, la surexpression de *Hoxa4* provoque la formation de mégacôlon, soit une accumulation de matières fécales dans le colon qui serait à l'origine du décès des individus avant l'âge adulte (Wolgemuth et al., 1989). L'inactivation du gène *Hoxa5* résulte en un phénotype au niveau gastro-intestinal avec un retard dans la maturation intestinale et une désorganisation de l'épithélium gastrique (Aubin et al., 1999; Aubin et al., 2002a). Une altération du système digestif a également été rapportée pour la mutation du gène *Hoxc8* (Le Mouellic et al., 1992; Tiret et al., 1998). Par ailleurs, la délétion des gènes du complexe *HoxD*, excepté *Hoxd1*, provoque un retard de développement des individus qui présentent une absence du sphincter ileocaecal et une transition continue entre l'iléum et le côlon suggérant un rôle des gènes du complexe *HoxD* pour définir les constriction physiologiques le long du mésoderme digestif (Kondo et al., 1996; Sekimoto et al., 1998; Zákány et Duboule, 1999a).

### 1.3.2.5. Gènes *Hox* et le système urogénital

La première indication d'une implication des gènes *Hox* dans le développement du système urogénital vient du fait que de nombreuses mutations causent la stérilité. En accord avec le principe de colinéarité, ce sont surtout les gènes des groupes paralogues 9, 10, 11 et 13 qui sont impliqués. De ce fait, le gène *Hoxa9* est exprimé au niveau des oviductes, *Hoxa10* et *Hoxa11* au niveau du col utérin et de l'utérus et enfin *Hoxa13* au niveau du vagin et de la vulve (Du et Taylor, 2004). Un phénotype de stérilité est observé lors de l'inactivation des gènes *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Hoxd11*, *Hoxa13* et *Hoxd13* (Dollé et al., 1993a; Davis et Capecchi, 1994; Davis et al., 1995; Favier et al., 1995; Hsieh-Li et al., 1995; Rijli et al., 1995; Satokata et Uchiyama, 1995; Benson et al., 1996; Kondo et al., 1996; Podlasek et al., 1997; Warot et al., 1997). Par exemple, les mâles *Hoxa10*<sup>-/-</sup> et *Hoxa11*<sup>-/-</sup> sont atteints de cryptorchidisme et présentent une transformation de type homéotique au niveau du canal déférent qui acquiert des caractéristiques de l'épididyme. Chez les femelles, on observe une

transformation de la première partie de l'utérus qui acquiert des caractéristiques d'oviducte (Hsieh-Li et al., 1995; Rijli et al., 1995; Satokata et Uchiyama, 1995; Benson et al., 1996). L'expression du gène *Hoxa10* au niveau de l'utérus varie avec le cycle reproductif atteignant un niveau maximal au moment de l'implantation. Ainsi, la stérilité des femelles *Hoxa10*<sup>-/-</sup> et *Hoxa11*<sup>-/-</sup> serait associée à un défaut d'implantation des embryons dans l'utérus où les deux gènes auraient un rôle prépondérant en modulant la réponse à la progestérone et à l'œstrogène (Benson et al., 1996; Taylor et al., 1998; Eun Kwon et Taylor, 2004). Pour leur part, les individus *Hoxd13* sont atteints d'hypofertilité associée à une malformation de l'os pénien et présentent une réduction de la ramification des ductules prostatiques qui se produit normalement de façon postnatale (Dollé et al., 1993a; Podlasek et al., 1997). Par ailleurs, le gène *Hoxa13* peut compenser pour la perte de fonction *Hoxd13* lors de la morphogenèse du tractus génital. La mutation combinée de ces deux gènes montre un phénotype exacerbé avec une absence de bourgeon génital et une stérilité chez les individus mâles survivants, suggérant une redondance fonctionnelle entre les deux gènes (Kondo et al., 1997; Warot et al., 1997). Ces mâles *Hoxa13*<sup>-/-</sup>/*Hoxd13*<sup>-/-</sup> présentent une hypoplasie de la glande séminale et du corps caverneux ainsi qu'une perte de certaines glandes sexuelles accessoires. Chez les femelles doubles mutantes, on observe une agénésie du col utérin ainsi qu'un rapprochement de l'urètre et du vagin pouvant aller jusqu'à la fusion (Warot et al., 1997; Scott et al., 2005).

Les gènes *Hox* sont également impliqués dans le développement du rein puisque la surexpression du gène *Hoxb7* cause une duplication rénale (Argao et al., 1995). La mutation combinée des gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* se traduit par des anomalies rénales allant jusqu'à l'agénésie. L'uretère de ces individus présente moins de ramifications et l'hypoplasie rénale peut être accompagnée de transformations homéotiques au niveau du canal déférent (Patterson et al., 2001). La mutation conjointe des trois gènes du groupe paralogue 11 montre que les gènes *Hoxa11*, *Hoxc11* et *Hoxd11* seraient nécessaires pour déterminer la localisation le long de l'axe AP pour l'induction rénale métanéphrique (Wellik et al., 2002). Les doubles mutants *Hoxa13*/*Hoxd13*, quant à eux, présentent une dilatation des cavités rénales associée à un défaut d'entrée de l'urètre dans la vessie (Warot et al., 1997).

### 1.3.2.6. Gènes *Hox* et la formation des membres

L'analyse des lignées de souris mutantes pour les gènes *Hox* des groupes paralogues 9 à 13 des complexes *HoxA* et *HoxD* a permis de révéler leur implication dans la formation des membres (Rijli et Chambon, 1997; Kondo et al., 1998a). Hormis pour les gènes *Hoxb5* et *Hoxb6* dont la mutation influe sur le positionnement de la ceinture scapulaire (Rancourt et al., 1995), aucune évidence supportant un rôle des gènes des complexes *HoxB* et *HoxC* n'a été rapportée concernant une implication éventuelle dans la formation des membres. Le membre adulte se divise en trois parties : la partie antérieure du membre ou stylo-pode (humérus ou fémur), la partie postérieure du membre ou zeugopode (radius et ulna ou tibia et fibula) et la partie distale du membre ou autopode (carpes, métacarpes et phalanges ou tarse, métatarses et orteils). La mutation couplée des gènes *Hoxa11* et *Hoxd11* entraîne une perte complète du radius et de l'ulna (Davis et al., 1995). De même, la mutation des gènes *Hoxa9* et *Hoxd9* cause des malformations de l'humérus (Fromental-Ramain et al., 1996a). Les gènes des groupes 11, 12 et 13 agissent de façon dose dépendante pour contrôler la taille et le nombre des doigts (Zákány et al., 1997a; Zákány et Duboule, 1999b). De plus, la fonction des gènes du groupe paralogue 10 est requise pour la spécification du stylo-pode des membres postérieurs alors que le groupe paralogue 11 spécifie le zeugopode de ces membres (Wellik et Capecchi, 2003).

D'autres études montrent l'implication des gènes des groupes paralogues 5 et 8. Ainsi, la mutation du gène *Hoxa5* résulte en une malformation de la ceinture scapulaire, détaillée dans la section 1.5.3.1, qui se caractérise par un acromion interrompu ou absent (Aubin et al., 2002b). De même, la mutation combinée des gènes *Hoxa5*, *Hoxb5* et *Hoxc5* provoque une absence du radius et du premier doigt (McIntyre et al., soumis). On peut également observer une malformation de la crête du deltoïde chez les individus *Hoxc8*<sup>-/-</sup>, suggérant un rôle de ce gène dans la spécification du membre antérieur. Ceci est consistant avec l'expression ectopique de *Hoxb8*, sous contrôle du promoteur du gène *RARβ2*, qui interfère avec la spécification antéro-postérieure du membre antérieur (van den Akker et al., 2001). Comme la mutation du gène *Hoxa13* est embryonnaire létale, un mutant conditionnel du complexe A (*HoxA*) a été généré et utilisé pour étudier spécifiquement l'impact de la délétion du complexe *HoxA* dans le développement des membres. La mutation conditionnelle de *HoxA* résulte en des zeugopodes et autopodes anormaux avec un

effet plus prononcé que la mutation simple du gène *Hoxa11*, laissant supposer une participation du gène *Hoxa10* dans la spécification de ces structures. Lorsque la mutation conditionnelle *HoxA* est couplée à la mutation *HoxD*, on observe une mort périnatale ainsi que des membres tronqués qui présentent un programme développemental précoce interrompu. Ceci serait expliqué par le fait que la mutation des complexes *HoxA* et *HoxD* entraîne une baisse d'expression de *Shh* qui est un facteur essentiel pour compléter le programme développemental du membre (Kmita et al., 2005).

Les études présentées dans les sections précédentes démontrent la fonction essentielle des gènes *Hox* dans le développement embryonnaire puisqu'ils sont impliqués dans des processus primordiaux aussi variés que ceux qui définissent les systèmes respiratoire, digestif et reproducteur.

### 1.3.2.7. Gènes *Hox* et le développement post-natal

Bien que l'expression et la fonction embryonnaire des gènes *Hox* soient assez bien établies, ce n'est que récemment que l'étude de ces gènes chez l'adulte a pris son essor. Plusieurs études ont fait valoir leur implication dans les processus d'hématopoïèse. Ainsi, la dérégulation de l'expression des gènes *Hox* entraîne des effets sur la prolifération et la différenciation hématopoïétique allant du blocage du développement lymphoïde à la leucémie myéloïde aigüe (Borrow et al., 1996; Sauvageau et al., 1997; Lawrence et al., 1999a; Buske et Humphries, 2000). En particulier, la surexpression rétrovirale des gènes *Hoxb4* et *Hoxc4* active de façon significative la régénération des cellules souches hématopoïétiques (Thorsteinsdottir et al., 1999; Daga et al., 2000; Antonchuk et al., 2001). Pour leur part, les gènes *Hoxb3*, *Hoxb7*, *Hoxa9* et *Hoxa10* joueraient un rôle dans la détermination et la maturation des cellules sanguines, et le gène *Hoxa7* serait impliqué dans le développement des érythrocytes et des mégakaryocytes (Yaron et al., 2001; So et al., 2004). Le rôle des gènes *Hox* dans les processus hématopoïétiques fait intervenir plusieurs co-facteurs. Ainsi, les individus mutants pour les cofacteurs *Pbx1* et *Meis1* meurent pendant la gestation de problèmes hématopoïétiques sévères (DiMartino et al., 2001; Hisa et al., 2004).



L'inactivation de certains gènes *Hox* des groupes paralogues 3 et 13 révèle leur rôle potentiel dans la maintenance de l'intégrité de la peau et dans la formation du pelage. Ainsi, le gène *Hoxd3*, lorsqu'il est muté, entraîne une baisse de la cicatrisation des blessures (Uyeno et al., 2001). La fonction du gène *Hoxb13* serait, elle, nécessaire pour obtenir une réparation optimale des blessures en agissant comme promoteur de la différenciation épithéliale, qui est un processus important pour la régénération de la peau (Stelnicki et al., 1998; Mack et al., 2003; Mack et al., 2005). Les souris *Hoxc13<sup>-/-</sup>* ont une absence de poils, y compris les moustaches et les papilles filiformes de la langue, suggérant un rôle de ce gène dans les processus de formation du système pileux. De plus, la perte de fonction du gène *Hoxc13* entraîne une diminution de la survie puisque 90% des individus décèdent (Godwin et Capecchi, 1998).

Par ailleurs, la triple mutation des gènes *Hoxa9*, *Hoxb9* et *Hoxd9* conduit à une hypoplasie de la glande mammaire. Ainsi, les femelles mutantes sont incapables de nourrir leurs bébés car elles ne peuvent produire du lait (Chen et Capecchi, 1999). C'est également le cas pour les femelles *Hoxa5<sup>-/-</sup>* qui, contrairement à la mutation des gènes du groupe paralogue 9, présentent une hyperplasie de la glande mammaire qui sera décrite à la section 1.5.3.5 (Garin et al., 2006).

Donc, la fonction des gènes *Hox* n'est pas restreinte à la spécification du squelette axial. Les évidences actuelles montrent que les gènes *Hox* seraient impliqués dans les processus de renouvellement cellulaire et dans les changements physiologiques qui ont lieu tout au long de la vie adulte (Morgan, 2006). Il a été suggéré que les gènes *Hox* aient deux fonctions différentes. D'une part, l'homéose qui maintient l'état de détermination d'un segment pendant le développement et d'autre part, le contrôle de la morphogenèse et de l'organogenèse. C'est cette dernière fonction qui serait la fonction originelle des gènes *Hox* et ce n'est que lorsque les corps des animaux sont devenus plus complexes et possédant un nombre de structures plus important, ayant entraîné leur expression différentielle le long de l'axe AP et la maintenance de leur domaine d'expression, qu'ils auraient acquis leur fonction homéotique (Hombria et Lovegrove, 2003).



## 1.4. Ambiguïté de l'interprétation des phénotypes lors du maintien de la cassette de sélection

L'étude de la fonction des gènes *Hox* a principalement été menée par des études de perte de fonction. Cette dernière est le plus souvent obtenue en insérant une cassette de sélection dans les séquences codantes des gènes ciblés. Toutefois, dans certains cas, le maintien de cette cassette de sélection peut avoir des conséquences non négligeables sur l'interprétation des phénotypes. En effet, l'organisation des complexes *Hox* est très hiérarchisée et la destruction d'un locus peut interférer avec le contrôle transcriptionnel des gènes environnants (Olson et al., 1996). Chez les individus mutants pour le gène *Hoxa4*, on observe une modification de la limite antérieure du domaine d'expression du gène *Hoxa5* qui passe de pv3 à pv4/5. La mutation du gène *Hoxa4* affecte donc l'expression du gène *Hoxa5* ce qui peut expliquer que certains des phénotypes décrits soient similaires comme les transformations de postériorisation des vertèbres C7 et T1 (Aubin et al., 1998). Il y a aussi possibilité de compétition de l'activité des éléments régulateurs entre le promoteur du gène ciblé et le promoteur du gène de sélection. D'autres cas où le maintien de la cassette de sélection induit des interactions entre le promoteur de la cassette de sélection et les éléments de contrôle des gènes *Hox* ont été rapportés. Ainsi, la mutation du gène *Hoxd10* interfère avec l'expression du gène *Hoxd9* (Rijli et al., 1994), la mutation du gène *Hoxc4* avec celle des gènes *Hoxc5* et *Hoxc6* (Boulet et Capecchi, 1996) et la mutation du gène *Hoxb2* avec celle des gènes *Hoxb1* et *Hoxb4* (Barrow et Capecchi, 1996).

Lorsque le locus du gène *Hoxa2* est ciblé de façon à flanquer les exons du gène de sites *loxP* et la cassette de sélection de sites *frt* (*Hoxa2<sup>neo</sup>*), on observe un retard de croissance et une mortalité à trois semaines des individus homozygotes pour cet allèle. Cette observation suggère une interférence de la cassette de sélection car le gène n'est pas muté. Lorsque la cassette de sélection est excisée par action de la Flp recombinase (*Hoxa2<sup>flox</sup>*) qui supprime spécifiquement les séquences bordées de sites *frt*, les individus ne présentent alors aucun phénotype particulier. Ainsi, le phénotype observé chez les individus *Hoxa2<sup>neo/neo</sup>* est dû au maintien de la cassette de sélection qui influence l'expression du gène en diminuant son expression dans r2. De plus, chez ces individus, on observe un phénomène similaire sur le domaine d'expression du gène *Hoxa1* qui se retrouve étendu

jusqu'à r1. La délétion de la cassette de sélection permet de retrouver une expression normale du gène *Hoxa1* (Ren et al., 2002). De même, la génération de deux mutants pour le gène *Hoxb8*, l'un avec maintien de la cassette de sélection (*Hoxb8<sup>neo</sup>*), l'autre avec délétion de cette cassette (*Hoxb8<sup>lox</sup>*), montre une transformation homéotique au niveau de T1, qui est présente chez les individus *Hoxb8<sup>neo</sup>* mais absente chez les individus *hoxb8<sup>lox</sup>*. Il s'agit donc d'un phénotype associé au maintien de la cassette de sélection. Le même défaut au niveau de T1 a déjà été décrit chez les mutants *Hoxb9* et *Hoxb6* (Chen et Capecchi, 1997). Or, on retrouve une mauvaise expression de ces deux gènes chez les individus *Hoxb8<sup>neo</sup>* (postériorisation d'un somite) mais jamais chez les individus *Hoxb8<sup>lox</sup>*. La présence du gène de résistance à la néomycine dans le locus du gène *Hoxb8* semble, donc, interférer avec les patrons d'expression des gènes environnants. Ceci pourrait résulter en un phénotype de transformation homéotique associé à T1. Lorsque la cassette de sélection est enlevée, le patron d'expression des gènes environnants redevient normal et on n'observe plus de phénotype au niveau du squelette axial (Greer et Capecchi, 2002). Van den Akker et collaborateurs (1999) ont déjà rapporté une mutation du gène *Hoxb8* qui présente des anomalies du squelette axial similaires à celles observées chez le mutant *Hoxb8<sup>neo</sup>*. Cependant, contrairement à ce dernier, le mutant généré au sein du groupe du Dr Deschamps retient le gène bactérien *lacZ* (*Hoxb8<sup>lacZ</sup>*) au lieu de la cassette de résistance à la néomycine. Ce gène rapporteur pourrait interférer de la même façon avec les gènes environnants et expliquer la similarité des phénotypes entre les individus *Hoxb8<sup>neo</sup>* et *Hoxb8<sup>lacZ</sup>* (van den Akker et al., 1999; Greer et Capecchi, 2002). Il s'avère donc très important de relativiser les phénotypes décrits lors des études de perte de fonction d'un gène par insertion d'une cassette de sélection. En effet, les études précédemment décrites, ainsi que d'autres études récentes, ont montré que les marqueurs de sélection pourraient avoir une incidence sur la régulation et l'épissage des gènes cibles et des *loci* environnants, introduisant de ce fait une ambiguïté dans la relation génotype/phénotype (Lerner et al., 1993; Jacks et al., 1994; Carmeliet et al., 1996; Pham et al., 1996; Meyers et al., 1998; Müller, 1999). Toutefois, le maintien du marqueur de sélection peut aussi amener la production d'allèles hypomorphes intéressants pour l'étude de mutations létales (Meyers et al., 1998; Partanen et al., 1998). Il est possible de supprimer l'interférence liée à la présence de la cassette de sélection en l'éliminant par une recombinaison site-spécifique (Meyers et

al., 1998; Farley et al., 2000). De plus, une mutagenèse conditionnelle peut être très utile dans le cas d'un gène, comme *Hoxa5*, qui présente un patron d'expression relativement vaste. En effet, une activation tissu-spécifique peut permettre de définir le rôle physiologique de ce gène dans un tissu donné (trachée, poumon, estomac, intestin, ou encore le rein) sans compromettre ses autres fonctions dans l'organisme. Enfin, le contrôle de la mutagenèse, de façon dépendante du temps, permet une différenciation entre les effets dus à une déplétion totale ou inductible d'une protéine, mais aussi l'étude fonctionnelle du gène à différents moments durant le développement (Müller, 1999).

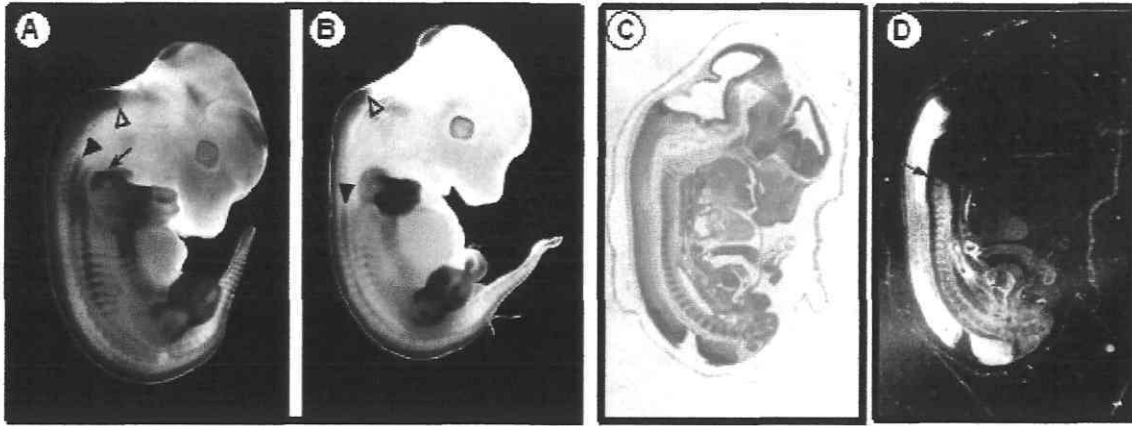
## 1.5. Notre modèle d'étude : le gène *Hoxa5*

Dans le laboratoire, nous étudions plus spécifiquement le gène *Hoxa5*. Ce dernier est l'orthologue chez les vertébrés du gène *sex comb reduced* de la drosophile. Le remplacement du gène *src* par le gène *Hoxa5* chez la drosophile montre que les propriétés fonctionnelles sont conservées entre les deux gènes (Zhao et al., 1993). Chez la souris, le gène *Hoxa5* est un des membres des gènes du complexe *HoxA* localisé sur le chromosome 6. Il est composé de deux exons qui codent pour une phosphoprotéine de 270 acides aminés (AA) capable de lier l'ADN via sa boîte homéo et d'agir comme facteur de transcription.

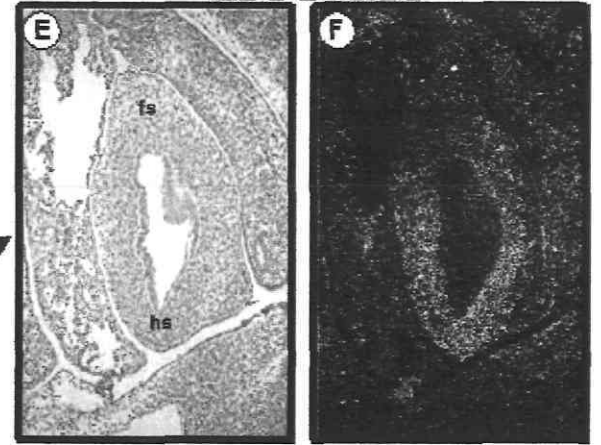
Chez l'embryon murin, on détecte par analyse Northern quatre transcrits *Hoxa5* qui sont initiés à partir d'au moins deux promoteurs distincts (1 proximal et 1 distal). De ces quatre transcrits de 1.8 kb, 5 kb, 9.5 kb et 11 kb, le transcrit le plus abondant est celui de 1.8 kb qui est initié au niveau du promoteur proximal et qui correspond aux deux exons du gène (Jeannotte et al., 1993). Concernant les 3 longs transcrits, ils incluent le court transcrit (Y. Coulombe et L. Jeannotte, non publié) et ils s'initient en amont du site d'initiation du court transcrit, dans les séquences flanquantes du gène *Hoxa7* (Zákány et al., 1988; Larochelle et al., 1999). Le transcrit de 1.8 kb commence à être détecté au stade embryonnaire E8.0-8.25 au niveau des somites 5-7. À ce stade du développement, aucun signal n'est détecté lorsqu'on utilise une sonde qui ne reconnaît que les trois longs transcrits. Au stade E12.5, le domaine d'expression du gène *Hoxa5*, dans le tube neural, possède une limite antérieure d'expression qui correspond à la base du myélocéphale, alors que la frontière pour les longs transcrits correspond à la jonction du myélocéphale et

du tube neural. Dans la colonne vertébrale, cette limite s'établit au niveau de la dixième prévertèbre pour les longs transcrits et au niveau de la troisième prévertèbre pour l'ensemble des transcrits démontrant une expression spécifique du transcrit de 1.8 kb entre pv3 et pv10 (figure 1.10) ; (Aubin et al., 1998; Larochelle et al., 1999). La région de la scapula exprime également spécifiquement le transcrit de 1.8 kb (figure 1.10). Il appert donc que les trois plus longs transcrits sont exprimés plus tardivement et dans des structures plus postérieures, suggérant une régulation différente de celle du transcrit de 1.8kb. Ces longs transcrits présentent une expression spatio-temporelle comparable à celle du gène *Hoxa7* suggérant un partage d'éléments régulateurs. Enfin, l'expression du gène *Hoxa5* est retrouvée dans le mésenchyme de divers organes (Figure 1.10), dérivés des composés mésodermiques, comme le poumon, l'estomac, l'intestin, les reins (Jeannotte et al., 1993), la glande mammaire (Garin et al., 2006), le thymus, la rate, les ovaires (Morneau et Jeannotte, non publié) ou encore les membres (Larochelle et al., 1999). Pour sa part, la protéine Hoxa5 de 270 AA a un poids estimé de 29273 Da et un patron de migration sur gel situé entre 35 et 43 kDa dépendamment de son état de phosphorylation (Odenwald et al., 1987). Cette protéine reconnaît un site de liaison CpyPyNATTAT/GPy (Odenwald et al., 1989). Le motif ATTA de ce site de reconnaissance est important car une mutation se traduit par une incapacité à lier l'ADN (Odenwald et al., 1989). Ce site de reconnaissance est retrouvé dans les régions promotrices de plusieurs gènes incluant le gène *p53* (Raman et al., 2000a; Goodman et Scambler, 2001), le récepteur de la progestérone (Raman et al., 2000b), le gène humain du transporteur de la noradrénaline (Kim et al., 2002), le gène *pcp2* spécifique des cellules de Purkinje (Sanlioglu et al., 1998) ou encore le gène *Hoxa5* lui-même suggérant une autorégulation du gène qui est décrite à la section 1.6 (Odenwald et al., 1989; Zhao et al., 1996; Aubin et al., 1998).

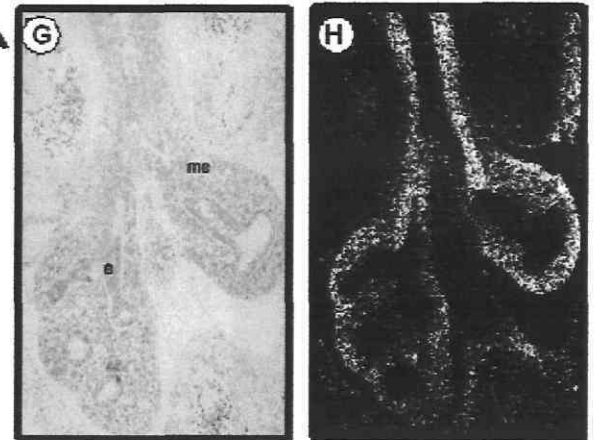
La protéine Hoxa5 est exprimée de façon superposable au transcrit de 1.8 kb chez l'embryon, confirmant ainsi le rôle fonctionnel de ce transcrit (Joksimovic et al., 2005). Ainsi, la protéine est détectée dans la partie caudale du cerveau postérieur, dans la colonne prévertébrale entre pv3 et pv10, dans le mésenchyme pulmonaire, trachéal, intestinal et dans le membre antérieur (figure 1.11).



**ESTOMAC**



**SYSTÈME RESPIRATOIRE**





De part sa position centrale et son implication dans de nombreux processus d'organogenèse, le gène *Hoxa5* est un excellent modèle pour étudier les mécanismes impliqués dans la régulation et la fonction des gènes *Hox*.

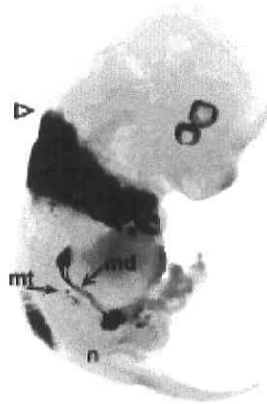
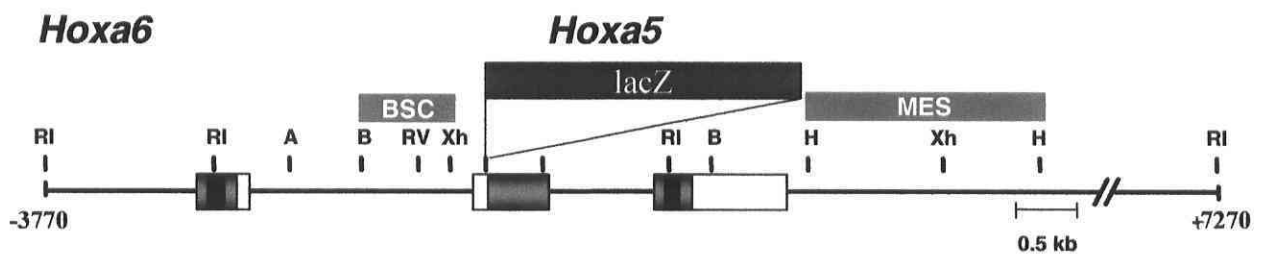
### **1.5.1. Les séquences régulatrices qui gouvernent l'expression du gène *Hoxa5***

Pour mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans la fonction du gène *Hoxa5*, des travaux ont été entrepris pour identifier les éléments régulateurs de l'expression développementale du gène. Zákány et coll. (1988) ont préalablement démontré qu'un fragment génomique de 4.3 kb s'étendant entre -1.5 kb et +2.9 kb permettait l'expression d'un gène rapporteur (*lacZ*) dans la région dorsale de la corde spinale entre les stades embryonnaires E11.0 et E13.0. Toutefois, cette construction est loin de reproduire l'ensemble de l'expression spatio-temporelle du gène *Hoxa5* suggérant la présence de séquences additionnelles nécessaires à la régulation spatio-temporelle de l'expression embryonnaire du gène *Hoxa5*.

#### **1.5.1.1. Un fragment génomique de 11.1 kb contient des éléments régulateurs pour l'expression spatio-temporelle du gène *Hoxa5***

Une approche par transgénèse a montré qu'un fragment génomique de 11.1 kb, qui s'étend de -3.8 kb à +7.3 kb, est capable de reproduire en grande partie le patron d'expression spatio-temporel du transcrite *Hoxa5* de 1.8 kb (Larochelle et al., 1999). Ce fragment permet une expression dès le stade embryonnaire E8.0-8.25 au niveau des somites 5-7 tout comme l'expression du transcrite de 1.8 kb (Section précédente). Au stade E12.5, l'expression est retrouvée dans le tube neural au niveau dans la région brachiale ainsi que dans la région cervicale de l'axe AP dans la région comprise entre pv3 et pv10. L'expression est également retrouvée dans les tubules métanéphriques et les canaux mésonéphriques (figure 1.12). Le gène *Hoxa5* est exprimé dans les membres antérieurs dès le stade E9.5, puis à E12.5 dans le mésenchyme interdigital des membres antérieurs et dans la région proximale des membres postérieurs (figure 1.12). Le fragment de 11.1 kb englobe au moins deux éléments régulateurs : le BSC (Brachial Spinal Cord) ; (Tuggle et al., 1990)





et le MES (Mesodermal Enhancer Sequences) ; (Laroche et al., 1999) qui seront décrits dans les sections suivantes.

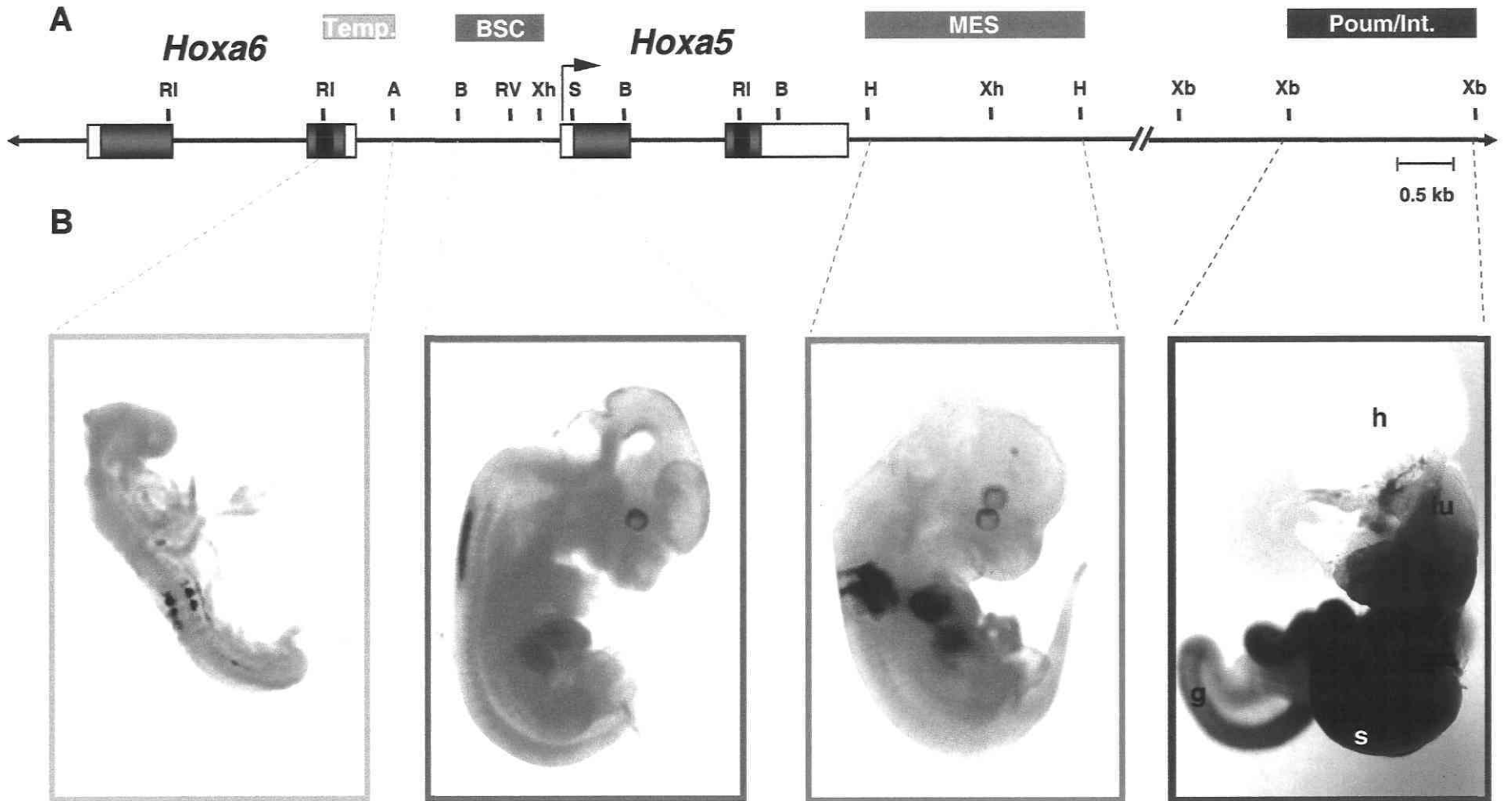
### 1.5.1.2. L'élément BSC

Un fragment génomique de 4.3 kb, s'étendant entre -1.5 kb à +2.9 kb, permet l'expression du gène rapporteur *lacZ* dans la région dorsale du tube neural entre E11.0 et E13.0 (Zákány et al., 1988). Par l'analyse de délétion, une séquence de 912 pb a été identifiée. Elle dirige spécifiquement l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* dans la région comprise entre les frontières rostrales et caudales des bourgeons des membres antérieurs. Le patron d'expression des transgènes est caractérisé par deux stries parallèles,

correspondant aux cellules dorso-latérales du tube neural, visibles entre la quatrième cervicale et la deuxième vertèbre thoracique. Par la suite, il a été montré que cet élément, capable de diriger l'expression dans la région brachiale du tube neural pouvait être restreint à une séquence de 604 pb localisée 235 pb en amont du premier exon. Cet élément BSC est responsable de l'expression du transgène dans la région brachiale du tube neural entre E11.0 et E13.0 (figure 1.13) ; (Tuggle et al., 1990). Des essais de retard sur gel, avec un extrait nucléaire obtenu d'embryons à mi-gestation, ont mis en évidence la présence de facteurs capables de lier spécifiquement 3 sites AAATAA présents dans le BSC. Ces facteurs, qui restent encore à être identifiés, montrent un degré d'activité de liaison le long de l'axe AP, à savoir que des extraits nucléaires, issus de régions plus antérieures de l'embryon, présentent une activité de liaison plus importante que les extraits issus de parties plus caudales. Enfin, la mutation de ces trois sites de liaison se traduit par une abolition de la liaison des facteurs sur le BSC, mais résulte aussi en une perte de l'expression des transgènes dans le tube neural, mettant ainsi en valeur un rôle important de la liaison de ces facteurs pour l'activité du BSC (Nowling et al., 1999).

### 1.5.1.3. L'élément MES

L'expression du gène *Hoxa5* est également altérée par des délétions de séquences situées en 3' du gène indiquant l'existence d'éléments régulateurs importants. Ainsi, la



délétion d'une séquence de 2.1 kb résulte en une perte de l'expression dans la région cervicale du squelette axial et dans les dérivés mésodermiques. Cette séquence, appelée MES, est située entre les positions +2.9 kb et +5 kb. Le MES dirige l'expression du gène *Hoxa5* dans les dérivés mésodermiques de la région cervicale (figure 1.13). L'absence du MES se traduit par une absence d'expression dans les structures dérivées du mésenchyme paraxial et latéral au niveau cervical. Le MES dirige donc spécifiquement l'expression du gène dans la région cervicale entre pv3 et pv10, dans les bourgeons des membres antérieurs, ainsi que dans le système urogénital (figure 1.13) ; (Larochelle et al., 1999). La poursuite de la caractérisation de cet élément régulateur, présentée dans les chapitres 2 et 3, a révélé que le MES renferme une région régulatrice impliquée dans le positionnement de la frontière d'expression postérieure des transgènes *Hoxa5/lacZ* au niveau de pv10 (Tabariès et al., 2005).

#### **1.5.1.4. L'élément poumon/intestin**

Bien que la séquence génomique de 11.1 kb soit capable de reproduire dans sa quasi-totalité le patron endogène du gène *Hoxa5*, l'expression détectée au niveau des systèmes respiratoire et digestif est incomplète (Larochelle et al., 1999). Cependant, la présence d'un élément régulateur positif, sensible au RA, a déjà été rapportée pour diriger l'expression du gène *Hoxa4* au niveau du poumon, de l'intestin et du métanéphros (Packer et al., 1998). Or, tel que mentionné à la section 1.2.2.1.1.1, le partage de séquences régulatrices est fréquent au sein des gènes *Hox*. Cette séquence intergénique *Hoxa4-Hoxa5* a donc été testée pour sa capacité à agir sur le promoteur du gène *Hoxa5*. Dans ce cas, on retrouve l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* au niveau de l'estomac, de l'intestin et des poumons (figure 1.13) ; (Moreau et Jeannotte, 2002). Ce patron d'expression, qui récapitule le patron endogène du gène *Hoxa5* dans ces organes, indique que le fragment *XbaI* de 1471 pb localisé entre les positions +9350 pb et +10822 pb est partagé entre les gènes *Hoxa4* et *Hoxa5* pour l'expression dans les systèmes respiratoire et digestif (Moreau et Jeannotte, 2002).

### 1.5.2. Etude de la fonction du gène *Hoxa5*

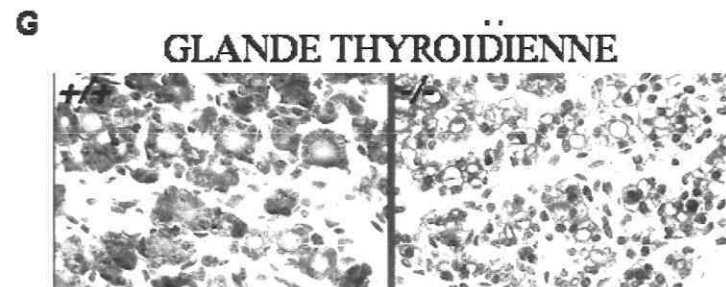
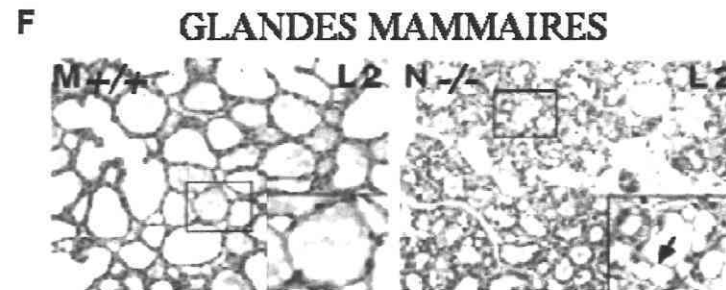
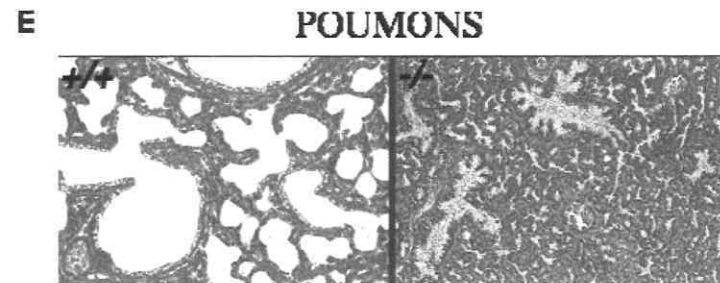
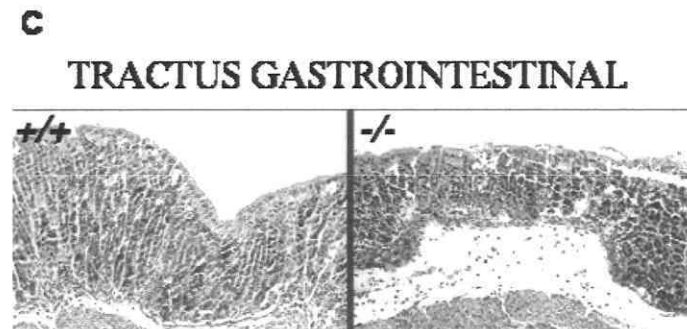
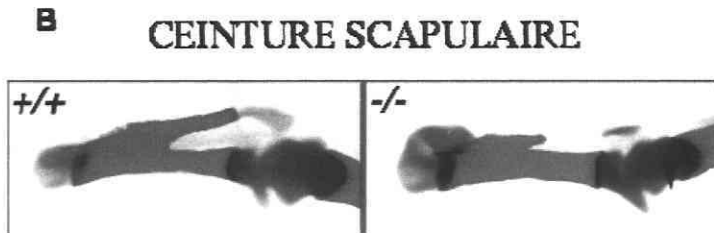
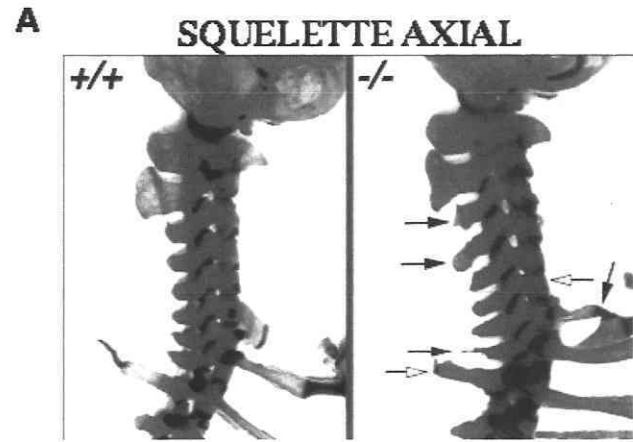
Afin d'étudier la fonction du gène *Hoxa5* pendant le développement embryonnaire, une lignée de souris mutantes pour le gène *Hoxa5* a été générée. Dans ce but, une cassette de sélection MC1-néo-A<sup>+</sup> a été insérée, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (ES), dans le deuxième exon du gène au niveau de la boîte homéo (Jeannotte et al., 1991; Jeannotte et al., 1993). L'introduction de cette cassette interrompt la protéine *Hoxa5* en détruisant son domaine homéo et sa capacité à lier l'ADN. Récemment, l'obtention d'un anticorps anti-*Hoxa5* a permis de démontrer qu'aucune protéine *Hoxa5* n'est produite chez les individus mutants pour la fonction du gène, confirmant que la mutation est bien nulle (figure 1.11) ; (Joksimovic et al., 2005).

La caractérisation des souris homozygotes mutantes menée dans le laboratoire a montré que la perte de fonction du gène *Hoxa5* résulte en une mortalité périnatale élevée. En effet, dans un environnement génétique mixte MF1-129/SvEv-C57BL/6, la moitié des individus meurent à la naissance (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Ce taux de mortalité atteint 72% dans un environnement 129/SvEv et 100% chez les individus C57BL/6 et Fvb (Garin et al., 2006). Ceci suggère la présence de gènes « modificateurs » spécifiques qui pourraient introduire une variabilité phénotypique en participant au taux de mortalité plus élevé pour certaines souches. Dans tous les cas, les individus homozygotes qui survivent sont fertiles (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Une surveillance journalière des portées a permis de mettre en évidence que la mortalité périnatale était accompagnée d'une détresse respiratoire. De plus, les individus morts présentent souvent un poumon collapsé ainsi que de l'air dans leur estomac et leur intestin indiquant que ces individus ne respirent pas normalement (Aubin et al., 1997). Afin de définir la cause de la mortalité associée à la perte de fonction du gène *Hoxa5*, et pour identifier les structures affectées, une caractérisation des phénotypes des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> a été entreprise. Comme l'impact de la mutation du gène *Hoxa5* est dépendant de l'environnement génétique, l'étude de la mutation a principalement été menée chez les souris 129/SvEv.

### 1.5.2.1. Les phénotypes au niveau du squelette axial et appendiculaire

La caractérisation des souris homozygotes mutantes a révélé que la perte de fonction du gène *Hoxa5* résulte en des transformations du squelette axial situées entre la troisième vertèbre cervicale et la deuxième vertèbre thoracique (figure 1.14). Ainsi, chez les individus de souche mixte, la perte de fonction du gène *Hoxa5* entraîne l'apparition de côtes sur C7 qui acquiert des caractéristiques de T1. La perte du tuberculum antérieur sur C6 résulte en une cervicale ressemblant à C5. Dans quelques cas, on observe des côtes sur L1 qui ressemble alors à T13. La pénétrance des phénotypes est plus élevée (100%) dans la région C6-C7 qui est le domaine où l'expression du gène *Hoxa5* est la plus forte (Jeannotte et al., 1993). Dans les souches 129/SvEv et C57BL/6, les transformations observées chez les individus de souche mixte sur C6 et C7 sont retrouvées, mais avec une variabilité dans l'expressivité et la pénétrance des phénotypes (Tableau 1.1). On observe également la présence d'un processus spinal, normalement restreint à C2, sur C4 et dans une moindre mesure sur C3 (Tableau 1.1). Ceci peut être interprété comme une transformation homéotique d'antériorisation de ces vertèbres. De plus, au niveau de la jonction cervicothoracique, T2 présente parfois un processus spinal dorsal réduit, voire absent, chez les individus homozygotes mutants. De façon opposée, ce processus, normalement absent sur T1, est parfois présent sur T1 chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> (Tableau 1.1) ; (Aubin et al., 1998).

Enfin, chez près de 2/3 des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, l'acromion, une projection osseuse qui émerge de la *spina scapula*, est raccourci ou manquant et la structure osseuse est remplacée par un ligament (figure 1.14). Toutefois, ce phénotype est restreint aux individus de souche mixte (Aubin et al., 1998). Les souris *undulated* (*un*) sont des souris porteuses d'une mutation au sein du gène *Pax1*. Les souris *un/un* présentent des phénotypes similaires à ceux observés pour la mutation du gène *Hoxa5* (C6 en C5 et T2 en T1) mais sont surtout caractérisées par un acromion réduit ou absent. Afin d'étudier la possibilité d'une interaction génétique entre les gènes *Pax1* et *Hoxa5*, une étude des doubles mutants a été entreprise. Elle a révélé un synergisme des deux gènes pour la spécification de C6, T1 et T2 (Aubin et al., 2002b). Au niveau de l'acromion, l'expression du gène *Hoxa5* corrèle avec les différentes étapes de la formation de l'acromion et aucune modification de l'expression du gène *Hoxa5* n'est observée chez les mutants pour la fonction du gène *Pax1*.





	outbred		129/SvEv		C57BL/6	
	(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)	(+/+)	(-/-)
<b>Nouveaux-nés</b>						
<b>côtes sur C7 (a)</b>						
Absentes	28	1	33	1	23	0
Petites	8	60	15	36	9	15
Allongées	0	37	0	37	0	45
Fusionnées au sternum	0	5	0	0	0	3
Fusionnées à T1	0	13	0	1	0	19
Unilatérales	4	1	9	1	7	0
Bilatérales	2	48	3	36	1	30
<b>Processus dorsal sur T1</b>						
Absent	18	23 (b)	24	8	15	13
Présent	0	21 (b)	0	29	1	17
<b>Processus dorsal sur T2</b>						
Absent/reduit	6	12 (b)	1	34	2	26
<b>Acromion (a)</b>						
Normal	35	56	48	70	29	58
Anormal	1	42	0	4	3	2
Unilatéral	1	14	0	4	1	2
Bilatéral	0	14	0	0	1	0
Nombre d'individus	18	49	24	37	16	30
<b>Adultes</b>						
<b>Processus dorsal sur C3</b>						
Absent	12	19	5	27	5	2
Présent	0	7	0	0	0	2
<b>Processus dorsal sur C4</b>						
Absent	12	6	5	12	5	1
Présent	0	20	0	15	0	3
<b>Processus osseux entre</b>						
C2-C3	3	12	1	3	0	0
C3-C4	0	17	0	9	0	2
C4-C5	0	4	0	2	0	0
Nombre d'individus	12	26	5	27	5	4

(a) Les côtés droits et gauches ont été décomptés indépendamment

(b) Pour ces observations, 44 individus ont été analysés

Tableau I.1 : Analyse morphologique comparative du squelette axial selon le génotype et la souche de souris étudiée (Selon Aubin et al., 1998).

De façon similaire, la mutation du gène *Hoxa5* n'interfère pas avec celle du gène *Pax1* hormis vers E10.5 où l'expression est perturbée de façon transitoire. Des études histologiques ont révélé une chondrogenèse anormale chez les individus *un/un* et *Hoxa5<sup>-/-</sup>* qui peut être associée à une prolifération persistante des cellules péri-chondriales dans la région de l'acromion chez les individus *Hoxa5<sup>-/-</sup>*. Cette étude révèle donc que le gène *Pax1* serait requis pour le recrutement de cellules précurseurs de l'acromion, alors que le gène *Hoxa5* donnerait les informations essentielles pour la formation adéquate de l'acromion en s'assurant que l'expression du gène *Pax1* se fasse au bon moment et au bon endroit pendant la morphogenèse de la ceinture pectorale. Le gène *Hoxa5* jouerait également un rôle dans la spécification des destinées des lignées cellulaires péri-chondriales et chondrogéniques de façon dépendante du gène *Sox9*, un marqueur de la différenciation des chondrocytes et de la formation de cartilage (Aubin et al., 2002b).

### 1.5.2.2. Phénotype respiratoire des individus *Hoxa5<sup>-/-</sup>*

La caractérisation des souris homozygotes mutantes menée dans le laboratoire a montré que la perte de fonction du gène *Hoxa5* résulte en une mortalité périnatale élevée qui est associée à une détresse respiratoire. Une caractérisation du système respiratoire des individus mutants a été entreprise. L'étude des individus mutants, avant la naissance, révèle qu'ils présentent une désorganisation de la trachée. En particulier, chez les individus mutants pour le gène *Hoxa5*, le cartilage cricoïde est plus épais à cause d'une fusion avec les premiers anneaux trachéaux. On observe également des défauts au niveau des anneaux trachéaux qui sont désorganisés et dont le nombre est réduit. Une réduction du diamètre et une désorganisation de l'épithélium trachéal sont aussi observées ainsi qu'un épaissement de la *lamina propria*. Cette dernière est dérivée de la couche mésenchymale pendant l'ontogenèse trachéale (Aubin et al., 1997). Chez les individus les plus affectés, la réduction du diamètre trachéal peut aller jusqu'à l'occlusion totale, expliquant une partie des mortalités périnatales observées (figure 1.14). Toutefois, le phénotype trachéal ne peut expliquer la totalité de la mortalité périnatale compte tenu de la variabilité de l'expressivité du phénotype. Le gène *Hoxa5* étant exprimé au niveau du poumon, une étude de la fonction pulmonaire chez les individus *Hoxa5<sup>-/-</sup>* a été entamée.

La vérification de l'expression des protéines de surfactant (SP), essentielles pour l'expansion pulmonaire, montre que la mutation du gène *Hoxa5* entraîne une diminution de leur production. Une analyse histologique révèle un défaut de morphogénèse du poumon dès le stade E12.5 chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> qui présentent une désorganisation du mésenchyme, une réduction de la ramification des bronches à E15.5 et des poumons avec une apparence plus compacte à E18.5 (figure 1.14). Donc, aucun délai n'est observé dans l'ontogénèse du poumon, mais il y a altération de la morphogénèse pulmonaire en l'absence du gène *Hoxa5*. Ce gène codant pour un facteur de transcription, l'étude de cibles potentielles impliquées dans la production des protéines de surfactant, comme les gènes *Nkx2.1* ou *Foxa2*, ou dans la ramification pulmonaire, comme le gène *N-myc*, a été entreprise. L'absence de fonction du gène *Hoxa5* résulte en une baisse de l'expression des gènes *Nkx2.1* et *Foxa2* et en une augmentation de l'expression du gène *N-myc*. Par conséquent, la perte de fonction du gène *Hoxa5* entraîne une expression altérée de régulateurs essentiels impliqués dans la fonction pulmonaire et dans la prolifération cellulaire. Toutefois, ces différents effecteurs sont exprimés de façon épithéliale alors que le gène *Hoxa5* est exprimé de façon mésenchymale suggérant une action du gène *Hoxa5* par l'intermédiaire d'interactions mésenchyme-épithélium (Aubin et al., 1997).

Ainsi, la perte de fonction du gène *Hoxa5* entraîne un problème développemental au niveau du poumon. Or, la morphogénèse pulmonaire se termine après l'alvéogénèse qui se produit entre les jours (J) 5 et 30 après la naissance. L'alvéogénèse permet d'augmenter la surface respiratoire pour l'échange des gaz vitaux. Les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> qui survivent à la naissance présentent des défauts pulmonaires, caractérisés par un défaut de septation alvéolaire, qui se traduit par l'apparition de grands espaces aériens et donc d'une réduction de la surface d'échange gazeux (Mandeville et al., 2006). Ceci résulte en une limitation de la respiration des individus mutants qui compensent leur surface réduite d'échanges gazeux par une augmentation de leur fréquence respiratoire et leur ventilation globale par minute (Kinkead et al., 2004).

Après la naissance, la croissance pulmonaire est retardée chez les individus mutants puis rattrapée entre J15 et J30. Cette observation peut être corrélée avec une baisse de la prolifération jusqu'à J5 puis une augmentation à partir de J15. L'étude de différents

marqueurs de la fonction épithéliale révèle que les cellules caliciformes, sécrétrices de mucus, sont plus nombreuses dans l'épithélium trachéal des individus mutants et présentes de façon ectopique dans les voies respiratoires plus distales (Mandeville et al., 2006). Cette hypersécrétion de mucus est associée à un processus inflammatoire. En effet, on observe une augmentation du nombre de macrophages activés qui produisent la métalloprotéinase MMP12 capable de dégrader l'élastine qui forme des fibres qui permettent l'élasticité nécessaire pour la respiration. Un défaut de la capacité migratoire des précurseurs des myofibroblastes alvéolaires dans le poumon embryonnaire, normalement localisés au bout des *septas*, entraîne une localisation inappropriée des myofibroblastes alvéolaires chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> qui coïncide avec l'observation de fibres d'élastines désorganisées et déposées de façon aberrante dans le tissu pulmonaire à partir de J0. Ainsi, la protéine Hoxa5, qui est exprimée dans les myofibroblastes, appert nécessaire à leur positionnement. En retour, les myofibroblastes assurent le dépôt de l'élastine et la formation des *septas*. Par ailleurs, un suivi des progéniteurs des myofibroblastes révèle qu'ils sont incapables d'envahir correctement le poumon en développement suggérant une implication du gène *Hoxa5* dans la mobilité de ces cellules mésenchymales (Mandeville et al., 2006). L'ensemble de ces études révèle que le gène *Hoxa5* est impliqué dans l'ontogenèse mais aussi dans la maturation pulmonaire.

### 1.5.2.3. Phénotype digestif des mutants *Hoxa5*<sup>-/-</sup>

Le gène *Hoxa5* est exprimé dans le système digestif embryonnaire dès le stade E9.0. Au stade E11.0, un gradient rostro-caudal s'établit avec une expression plus importante du gène *Hoxa5* dans la partie postérieure de l'estomac. En absence du gène *Hoxa5*, on observe une altération morphologique de l'estomac et du colon proximal (figure 1.14). En effet, l'épithélium gastrique apparaît aminci et la sous-muqueuse est hypertrophiée. Au niveau du côlon proximal, la réduction de la longueur des villosités est accompagnée d'un épaissement de la sous-muqueuse. De plus, on observe une fonction altérée de l'estomac associée à une diminution de l'activité enzymatique de la pepsine qui est occasionnée par une diminution du nombre de cellules zymogéniques et d'une hyperplasie des cellules caliciformes suggérant un rôle éventuel du gène *Hoxa5* sur la différenciation cellulaire et l'organisation gastrique. Toutefois, l'étude des différents types cellulaires montre qu'ils

sont tous représentés dans l'estomac des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>. Néanmoins, en absence du gène *Hoxa5*, la composition cellulaire de l'estomac glandulaire, au niveau duquel l'expression du gène *Hoxa5* est la plus importante, progresse d'une zone proximale zymogénique à une région productrice de mucus à proximité du pylore. L'étude de la proportion des différents types cellulaires, dans la zone zymogénique de l'estomac, serait en accord avec l'acquisition de caractéristiques plus distales. De ce fait, la perte de fonction *Hoxa5* se traduit par une transformation de postériorisation de l'estomac glandulaire qui acquiert des caractéristiques intestinales (Aubin et al., 2002a). Pour déterminer l'implication du gène *Hoxa5* dans la morphogenèse de l'épithélium gastrique, l'étude de gènes cibles potentiels a été entreprise. Le gène *Shh* est normalement exprimé sous forme d'un gradient rostro-caudal alors que le gène *Ihh* est restreint à la partie caudale de l'épithélium gastrique. Pour sa part, le gène *Fgf10* est exprimé sous forme de gradient dans le mésenchyme stomacal avec une expression plus importante dans la partie postérieure de l'estomac. Lorsque la fonction du gène *Hoxa5* est abolie, on observe une restriction du domaine d'expression du gène *Shh* et une extension de ceux des gènes *Ihh* et *Fgf10* vers la partie antérieure de l'estomac. Ainsi, le gène *Hoxa5* agirait en donnant des informations essentielles pour la morphogenèse gastrique en s'assurant de l'expression des molécules signalétiques, notamment en définissant les domaines d'expression des gènes *Shh*, *Ihh* et *Fgf10* (Aubin et al., 2002a). Comme pour le poumon, certaines cibles moléculaires sont exprimées de façon épithéliale alors que le gène *Hoxa5* est exprimé dans le mésenchyme suggérant, de nouveau, un rôle du gène *Hoxa5* dans des interactions mésenchyme-épithélium. Parmi les cibles mésenchymales, on retrouve le gène *Fgf10*. Toutefois, des études de transfection d'un rapporteur *Fgf10-lacZ* dans des MEFs *Hoxa5*<sup>-/-</sup> n'ont pas permis de confirmer que le gène *Fgf10* soit une cible directe du gène *Hoxa5* (Déry et Jeannotte, non publié).

L'étude des nouveau-nés révèle également un retard dans l'acquisition du mode de nutrition adulte chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> (Aubin et al., 1999). L'expression du gène *Hoxa5* est initiée dans le mésenchyme intestinal au stade E9.0, puis devient restreinte au système nerveux entérique à E17.5. Après la naissance, cette expression entérique est retrouvée le long de l'axe duodénum/colon sous forme d'un gradient rostro-caudal. Une étude différentielle de l'expression des différents transcrits associés au gène *Hoxa5* montre

que seul le court transcrit est exprimé après E14.5, confirmant le rôle prédominant de ce transcrit pour la fonction du gène *Hoxa5*. À J15, l'activité des enzymes sucrase, tréhalase et maltase est à un niveau inférieur à celui des individus de type sauvage. A J30, ce taux revient à la normale suggérant un retard dans la maturation du petit intestin. L'analyse morphologique ne révèle aucune modification ou délai dans l'organisation des villosités dont le nombre et la longueur sont normaux. Pareillement, les différents types cellulaires sont représentés, indiquant que la mutation du gène *Hoxa5* n'affecte pas la morphogenèse ou l'organisation cellulaire du petit intestin. Comme pour le poumon, le gène *Hoxa5* pourrait diriger le programme de différenciation des entérocytes et la maturation fonctionnelle de l'intestin par l'intermédiaire d'interactions mésenchyme-épithélium (Aubin et al., 1999).

#### **1.5.2.4. La perte de fonction du gène *Hoxa5* entraîne une hypothyroïdie**

Dans l'environnement 129/SvEv, les adultes *Hoxa5* mutants survivants sont fertiles mais peuvent être distingués par leur taille plus petite et le retard dans l'ouverture des yeux et l'élévation des oreilles (Aubin et al., 1997; Aubin et Jeannotte, 2001; Meunier et al., 2003). Ces phénotypes sont typiques d'une hypothyroïdie chez les rongeurs et une étude histologique de la glande thyroïde des individus mutants pour la fonction du gène *Hoxa5* montre une désorganisation des follicules dès le stade E16.5. Ces follicules sont plus petits et présentent une accumulation anormale de thyroglobuline (figure 1.14). Malgré la désorganisation structurale transitoire de la glande thyroïde en fin de gestation chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, l'initiation de la morphogenèse n'est pas altérée. Par ailleurs, le gène *Hoxa5* joue un rôle transitoire dans les niveaux d'expression de régulateurs essentiels de la fonction de la glande thyroïde et de son développement. Ainsi, l'abolition de la fonction du gène *Hoxa5*, dans le mésenchyme, entraîne une expression altérée des gènes, *Nkx2.1*, *Ttf2* et *Pax8*, essentiels pour la formation et la fonction de la glande thyroïde. En conséquence, l'expression de gènes effecteurs de la thyroïde, soit la thyroglobuline et la thyroperoxydase est perturbée (Meunier et al., 2003). Comme dans le cadre de l'étude sur le poumon, les altérations globales associées à la perte de fonction du gène *Hoxa5* résultent en de petits changements dans l'expression de plusieurs gènes essentiels à l'ontogenèse et la fonction de l'organe (Aubin et al., 1997; Meunier et al., 2003).



### 1.5.2.5. Phénotype de la glande mammaire des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>

La formation de la glande mammaire est initiée pendant l'embryogenèse puis se termine après la naissance lors de la puberté et de la grossesse. Des phénotypes au niveau de la glande mammaire ont préalablement été rapportés pour les mutations des gènes *Hoxc6* et la mutation de 3 gènes du groupe paralogue *Hox9* suggérant un rôle de ces gènes dans le développement mammaire (Chen et Capecchi, 1999; Garcia-Gasca et Spyropoulos, 2000).

Par ailleurs, les nouveau-nés, dont la mère est *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, ont un taux de mortalité plus élevé par rapport à ceux dont la mère est *Hoxa5*<sup>+/-</sup>. De plus, peu ou pas de lait est retrouvé dans l'estomac des nouveau-nés ayant une mère homozygote mutante, suggérant un défaut de lactation et une fonction du gène *Hoxa5* au niveau de la glande mammaire. Comme pour la plupart des organes affectés par la perte de fonction du gène *Hoxa5*, ce dernier est exprimé dans le stroma et non dans l'épithélium de la glande mammaire. Chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, la croissance ductale est normale mais on observe une persistance des bourgeons terminaux (sites de prolifération intensive pour l'élongation et la ramification des canaux épithéliaux mammaires) chez les nullipares. Cette observation est associée à une augmentation de la prolifération épithéliale. Pendant la gestation, il y a augmentation de la densité lobulo-alvéolaire et du nombre de gouttelettes lipidiques indiquant un développement épithélial mammaire accéléré chez les mutants. Pendant la lactation, la glande mammaire présente des régions dépourvues de structures lobulo-alvéolaires ainsi que la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques (figure 1.14). Ce défaut de développement lobulo-alvéolaire expliquerait l'incapacité des mères *Hoxa5*<sup>-/-</sup> à nourrir correctement leurs petits (Garin et al., 2006).

De plus, des études de greffes montrent qu'un stroma de type sauvage est capable de restaurer le phénotype épithélial *Hoxa5*<sup>-/-</sup>. Au contraire, comme observé chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, la greffe de stroma mutant entraîne une augmentation de la prolifération de l'épithélium de type sauvage. Donc, le gène *Hoxa5* peut participer à la spécification de l'épithélium mammaire par l'intermédiaire d'interactions mésenchyme-épithélium (Garin et al., 2006).



D'autre part, le niveau d'expression du gène *p53* dans les cellules tumorales est plus faible que celui détecté dans des cellules normales. Or, plusieurs sites de liaison possible pour les protéines Hox sont présents dans le promoteur du gène *p53*. Le gène *Hoxa5* est lui-même diminué dans des cellules de cancer de sein (MCF7 et Hs578T) mais pas les autres gènes *Hox* testés (*Hoxa10*, *Hoxb3*, *Hoxb7* ou *Hoxc8*) ; (Raman et al., 2000a). Des études de co-transfection de cellules de cancer de sein, avec un gène rapporteur pour *p53*, montrent que le produit du gène *Hoxa5* est capable de transactiver le promoteur du gène *p53*. Ainsi, le gène *Hoxa5* posséderait des propriétés de suppresseur de tumeur via une activation de *p53*. En effet, une augmentation du niveau du gène *Hoxa5* dans des cellules MCF7 résulte en une augmentation du niveau de *p53* associée à une augmentation du taux d'apoptose. De plus, une étude *in vivo*, dans des tumeurs primaires de cancer, montre une absence de l'expression des gènes *Hoxa5* et *p53* suggérant que la baisse du niveau de *p53* résulte de l'absence du gène *Hoxa5* dans ces tumeurs (Raman et al., 2000a). Par ailleurs, une étude de l'interaction entre les gènes *p53* et *Hoxa5* a été entreprise dans le laboratoire. Pour ce faire, les individus doubles mutants ont été étudiés. Malheureusement, comme les individus mutants pour le gène *p53*, les doubles mutants meurent entre 3 et 4 mois en présentant majoritairement des lymphômes ne permettant pas l'étude d'un impact éventuel de la mutation du gène *Hoxa5* sur la formation de tumeur mammaire chez les individus doubles mutants (J. Paradis et L. Jeannotte, non publié).

Enfin, le gène *Hoxa5* a été proposé comme activateur transcriptionnel du gène du récepteur de la progestérone (PR) dans des cellules de cancer de sein (Raman et al., 2000b). Toutefois, aucun effet majeur de la perte de fonction du gène *Hoxa5* n'est observé sur l'expression du PR chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>. Le gène *Hoxa5* étant exprimé dans le stroma et le PR dans l'épithélium, une régulation directe semble improbable suggérant que l'impact de la mutation du gène *Hoxa5* sur l'expression du PR soit secondaire (Garin et al., 2006).

#### **1.5.2.6. Autres phénotypes associés à la perte de fonction du gène *Hoxa5***

La génération d'une lignée de souris transgénique, qui exprime ectopiquement le gène *Hoxa5* sous le contrôle du BSC (Section 1.5.1.2) dans la région brachiale dorsale du

tube neural à mi-gestation, a révélé son implication dans la signalisation nociceptive. En effet, les souris transgéniques présentent des défauts sensoriels et moteurs des membres antérieurs. L'administration d'un analgésique peut compenser pour le phénotype, suggérant une implication dans la signalisation de la douleur (Krieger et al., 2004). Ces souris transgéniques montrent également une déficience structurale du tube neural au niveau cervical, une différenciation altérée, une migration et une apoptose indépendante de *p53* des neurones de la corne dorsale superficielle (Krieger et al., 2004; Abbott et al., 2005).

Le noyau olivaire inférieur (ION) est une structure dans la partie caudale du cerveau postérieur essentielle pour la fonction du cervelet qui inclut l'apprentissage. L'expression du gène *Hoxa5* est spécifique dans la lamelle dorsale, dans la partie inférieure du ION, et la perte d'expression du gène *Hoxa5* entraîne une perte de l'expression de *BRN3A* chez les embryons à E18.5. Comme LIM1/2, *BRN3A* est un facteur de transcription qui marque les neurones, nouvellement arrivés dans ION, dans la partie ventrale du cerveau postérieur. Bien que le gène *Hoxa5* ne soit pas requis pour l'initiation de l'expression du gène *BRN3A*, il est essentiel pour son maintien, suggérant une interaction moléculaire entre les deux molécules (Joksimovic et al., en préparation). Ceci est en accord avec le fait que l'expression ectopique du gène *Hoxa5* résulte en une expression aberrante de *BRN3A* (Abbott et al., 2005).

Enfin, les cellules T se développent à partir de cellules progénitrices pluripotentes. Une importance du sentier de signalisation *Notch*, dans l'induction de la destinée des cellules T, est soulignée par le fait que la mutation du gène *Notch1* résulte en un arrêt du développement des cellules T (Radtke et al., 1999). De plus, au moins la moitié des cas de leucémies lymphoblastiques aiguës chez l'humain porte une mutation active dans le gène *Notch1* (Weng et al., 2004). Une étude par « microarray » entre deux populations de progéniteurs hématopoïétiques, ayant ou non entamées la signalisation *Notch*, révèle une augmentation de l'expression des gènes *Hoxa5*, *Hoxa9* et *Hoxa10* dans les cellules exprimant *Notch*. Ceci suggère un rôle de ces gènes dans les processus d'hématopoïèse. Pour le confirmer, l'étude des souris mutantes pour le gène *Hoxa5* a été initiée. Cette étude n'a révélé aucune modification dans la population des cellules sanguines B, T, NK et des cellules myéloïdes dans le thymus, la moelle osseuse et la rate. De plus, aucun problème

majeur n'est observé au niveau des cellules souches hématopoïétiques. Cependant, le haut taux de redondance fonctionnelle entre les gènes *Hox* pourrait masquer l'effet du gène *Hoxa5* dans les processus d'hématopoïèse (Weerkamp et al., 2006).

## 1.6. But des mes travaux de doctorat

Comme décrit précédemment, le gène *Hoxa5* est impliqué dans de nombreux processus d'organogenèse ainsi que dans la spécification du squelette axial au niveau du domaine antérieur de l'expression du gène *Hoxa5*. Il est toutefois intéressant de noter que tous les phénotypes associés à la perte de fonction du gène *Hoxa5* présentent des similitudes. Ainsi, le gène *Hoxa5* se trouve exprimé dans la composante mésenchymale des organes affectés alors que les effets associés à la perte de fonction sont majoritairement restreints aux épithélia (Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1999; Aubin et al., 2002a; Meunier et al., 2003; Garin et al., 2006; Mandeville et al., 2006). Ces données suggèrent un rôle du gène *Hoxa5* par l'intermédiaire d'interactions mésenchyme-épithélium. Ces mêmes études montrent que le gène *Hoxa5* est surtout impliqué dans les mécanismes de prolifération cellulaire et peu dans ceux de mort cellulaire programmée. De plus, les phénotypes rapportés dérivent majoritairement de structures n'exprimant que le transcrit majeur de 1.8kb soulevant l'importance fonctionnelle de ce transcrit. Cependant, il est inconcevable de penser que les longs transcrits soient produits en pure perte par l'organisme. Une caractérisation de ces longs transcrits a été entreprise et sera discutée dans le chapitre 5.

Le domaine d'expression spécifique du transcrit de 1.8 kb dans la région cervico-thoracique est restreint à la région localisée entre pv3 et pv10. Sachant que la perte de fonction du gène *Hoxa5* entraîne une altération des structures dérivées de cette région où l'expression du gène est dirigée par le MES, nous postulons que des facteurs pouvant lier le MES soient importants pour la spécification, dirigée par le gène *Hoxa5*, de la région cervico-thoracique (Larochelle et al., 1999). Pour déterminer l'action éventuelle de facteurs interagissant avec le MES pour restreindre l'expression du gène *Hoxa5* à la région pv3-pv10, la caractérisation du MES a été poursuivie et a révélé la présence d'au moins deux régions d'ADN impliquées dans son activité. Le fragment AvEc-164 pb est requis pour le positionnement de la frontière postérieure du domaine d'expression au niveau de pv10 et le

fragment PsHi-331 pb participe aux propriétés activatrices du MES. De plus, la fonctionnalité de ces deux fragments fait intervenir la liaison de facteurs agissant en *trans* sur le MES. L'ensemble de ces travaux sur la caractérisation de l'élément MES sera détaillé dans les chapitres 2 et 3.

Indépendamment, comme décrit à la section 1.4, le maintien de séquences exogènes au sein des locus *Hox* peut interférer avec l'analyse des phénotypes associés à la perte de fonction d'un gène (Section 1.4) ; (Rijli et al., 1994). Chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, des transcrits plus longs de 1kb (présence de la cassette de sélection) sont générés à partir de l'allèle mutant (Jeannotte et al., 1993). La limite d'expression antérieure de ces transcrits s'établit au niveau de pv10 alors qu'elle est inchangée dans les autres structures qui expriment le gène *Hoxa5* (Aubin et al., 1998). Cette abolition sélective entre pv3 et pv10, soit au niveau du domaine d'expression spécifique du court transcrit, soulève la possibilité d'une autorégulation par le produit du gène *Hoxa5*. Si cette hypothèse est fondée, les individus hétérozygotes pour la mutation du gène *Hoxa5* doivent avoir suffisamment de protéine Hoxa5 pour activer et/ou maintenir la transcription au niveau des promoteurs des deux allèles. Au contraire, s'il n'y a pas assez de protéine Hoxa5, aucune expression des différents allèles ne devrait être retrouvée entre pv3 et pv10. En fait, on observe une expression de l'allèle muté jusqu'à pv10 et celle de l'allèle de type sauvage jusqu'à pv3. De même, on observe aucun impact de la mutation du gène *Hoxa5* sur l'expression des transgènes contenant le fragment génomique de 11.1 kb décrit à la section 1.5.1.1. Ces données suggèrent plutôt que l'insertion de la cassette de résistance à la néomycine dans le gène *Hoxa5* interfère en *cis* avec son propre promoteur (Aubin et al., 1998). Puisque la cassette de sélection est maintenue chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, nous postulons que sa présence puisse être susceptible de participer aux phénotypes rapportés. Pour déterminer l'impact du maintien de la cassette de sélection chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, un mutant conditionnel pour le gène *Hoxa5*, dans lequel la cassette de sélection peut être excisée, a été généré et une analyse comparative des phénotypes obtenus a été entreprise. De plus, ce mutant conditionnel serait un outil utile à l'étude du gène *Hoxa5*. En effet, selon le choix de l'expression de la Cre recombinase, il pourrait aider à la compréhension des différentes fonctions du gène *Hoxa5* dans les différents organes où il est exprimé. Ce mutant permettrait également de définir l'importance de la fonction du gène *Hoxa5* à chacun des

stades du développement embryonnaire. De même, il sera possible de définir les fonctions du gène *Hoxa5* chez l'adulte et de vérifier si les phénotypes observés à ce stade sont une conséquence directe de la perte de fonction du gène lors du développement embryonnaire. La génération d'un mutant conditionnel pour le gène *Hoxa5* et sa caractérisation seront présentées au chapitre 4.

Enfin, l'ensemble de ces résultats sera discuté dans le contexte des connaissances actuelles sur la régulation et la fonction des gènes *Hox* et du gène *Hoxa5* en particulier.

## Chapitre II

**Cdx protein interaction to *Hoxa5* regulatory sequences contributes to *Hoxa5* regional expression along the axial skeleton.**

Sébastien Tabariès<sup>1#</sup>, Jérôme Lapointe<sup>1#</sup>, Terri Besch<sup>2</sup>, Marcelle Carter<sup>1</sup>, John Woollard<sup>2</sup>, Christopher K. Tuggle<sup>2</sup> and Lucie Jeannotte<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada, G1R 2J6

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, U.S.A.

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

Article publié en 2005 dans : *Molecular and Cellular Biology* 25, 1389-1401

## PRÉSENTATION

L'étude des séquences régulatrices qui gouvernent l'expression du gène *Hoxa5* ont permis d'isoler au moins deux séquences importantes. La première, l'élément BSC situé en 5' du gène *Hoxa5*, dirige spécifiquement l'expression du gène *Hoxa5* dans la région brachiale du tube neural (Zákány et al., 1988 ; Tuggle et al., 1990 ; Nowling et al., 1999). La deuxième, la séquence MES de 2.1 kb et située en 3' du gène *Hoxa5*, dirige spécifiquement l'expression du gène *Hoxa5* dans les dérivés mésodermiques de la région cervicale entre pv3 et pv10, dans les bourgeons des membres antérieurs, ainsi que dans le système urogénital (Larochelle et al., 1999). Nous avons poursuivi la caractérisation de la séquence MES. Ces travaux ont été entamés par Jérôme Lapointe, étudiant à la maîtrise et complétés lors de mes travaux de doctorat.

Nous avons utilisé une approche de transgénèse en pratiquant différentes délétions au sein du MES. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence d'un élément répresseur de 164 pb (appelé AvEc-164 pb) situé entre les sites *AvrII* et *Eco47III* (positions +4280 pb et +4444 pb). Cette séquence s'est avérée responsable du positionnement de la frontière postérieure du domaine d'expression des transgènes au niveau de pv10. En effet, en son absence, le domaine d'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* se trouve étendu jusqu'à l'extrémité caudale de l'embryon. Une analyse bioinformatique (TRANSFAC) des sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription a révélé la présence de nombreux sites pouvant lier les protéines Cdx. Ces dernières ont par ailleurs déjà été rapportées comme des régulateurs des domaines d'expression des gènes *Hox* (Charité et al., 1998).

Des études de retard sur gel réalisées avec les protéines Cdx de souris produites *in vitro* ont permis d'identifier deux sites de liaison inclus dans une séquence de 25 pb, la séquence Oligo1. La mutation ponctuelle des deux sites de liaison se traduit par une perte de la frontière postérieure au niveau de pv10 chez les embryons transgéniques confirmant ainsi l'effet de la liaison des facteurs Cdx pour la définition de la frontière postérieure du domaine d'expression du court transcrit du gène *Hoxa5* à ce niveau.



Afin de déterminer laquelle des trois protéines Cdx produites chez la souris était impliquée, nous avons d'abord introduit les transgènes *Hoxa5/lacZ* dans les lignées de souris mutantes pour la fonction du gène *Cdx1* et/ou *Cdx2*. Aucune modification de l'expression des transgènes n'a pu être observée suggérant que *Cdx1* et *Cdx2* ne seraient pas impliquées dans l'effet répressif du fragment AvEc-164 pb. Aucune souris mutante pour le gène *Cdx4* n'étant disponible lors de notre étude, nous avons étudié la capacité de la protéine *Cdx4* à lier le fragment AvEc-164 pb par des essais retard sur gel et de « supershift ». Nous avons ainsi pu démontrer que la protéine *Cdx4* était présente dans les extraits embryonnaires et capable de lier spécifiquement le fragment AvEc-164 pb. Donc, notre étude a permis d'identifier la protéine *Cdx4* comme un candidat potentiel intervenant dans l'activité répressive du fragment AvEc-164 pb sur l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* dans les régions postérieures à pv10.

Cet article est une contribution égale des deux premiers auteurs. Jérôme Lapointe a initié la caractérisation du MES en contribuant à la génération de plusieurs constructions de transgénèse et en localisant les deux sites de liaison aux protéines Cdx. Marcelle Carter a généré les embryons transgéniques par microinjection. Pour leur part, les membres du laboratoire du Dr Tuggle, Terri Besch et John Woolard, ont réalisé les études de retard sur gel. Personnellement, j'ai poursuivi l'étude de transgénèse en générant certaines des constructions et j'ai réalisé l'étude de l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* chez les individus mutants pour la fonction des gènes *Cdx1* et *Cdx2*. J'ai collaboré à l'écriture du manuscrit initiée par Jérôme Lapointe en étroite collaboration avec le Dr Jeannotte.

## ABSTRACT

*Hox* gene function is intimately linked to its correct developmental expression. The identification of *cis*-acting regulatory sequences and their associated *trans*-acting factors constitutes a key step in deciphering the mechanisms underlying the correct positioning of the functional domain of *Hox* genes along the anterior-posterior axis. We have identified DNA elements driving *Hoxa5* regionalized expression in mice, using as a starting point the 2.1 kb mesodermal enhancer (MES) localized in *Hoxa5* 3' flanking sequences. The MES sequence comprises regulatory elements targeting *Hoxa5* expression in the limbs, the urogenital and gastrointestinal tracts, and in the cervical-upper thoracic region of the prevertebral column. A 164 bp DNA fragment within MES caudally restricts *Hoxa5* expression at the level of prevertebra 10, corresponding to the posterior limit of its functional domain. Cdx proteins directly bind to this element *in vitro* via two conserved sites. Preventing Cdx binding by mutating the sites causes the caudal expansion of the transgene expression domain. Of all three murine Cdx proteins that bind this element *in vitro*, Cdx4 emerges as the potential regional posterior repressor of *Hoxa5* expression. The restrictive control provided by Cdx interaction to *Hoxa5* regulatory sequences could be one of the critical events in cervicothoracic axial specification.

## INTRODUCTION

The establishment of the morphological diversity of the body plan requires that the genetic information must be processed to ultimately dictate specific shapes in subsets of domains along the body axes. In this cascade of molecular events, *Hox* genes are key components defining how and where structures will be elaborated. This gene family encode transcription factors specifying regional identity along the embryonic axes of diverse organisms. The murine genome contains 39 *Hox* genes organized into four clusters, *HoxA* to *HoxD* (35). The organization of *Hox* complexes is fundamental for the precise spatio-temporal regulation and function of each gene. A colinear relationship exists between the relative order of *Hox* genes on the chromosome, their expression domain along the anterior-posterior axis, and their temporal onset: genes located at the 3' end of the clusters are expressed earlier and more anteriorly in the embryo than those in more 5' positions (16, 31). As a result, *Hox* gene expression domains are both spatially restricted and overlapping, extending from specific anterior boundaries down to the caudal end of the embryo. *Hox* developmental functions were first extrapolated from these expression patterns. However, mutational analyses of murine *Hox* genes have shown that their domains of action are mainly restrained to the anterior-most region of their expression domain (4, 56). *Hox* gene function is also intimately linked to its correct developmental regulation as illustrated by the homeotic transformations observed when *Hox cis*-acting regulatory elements are mutated (17, 22, 65).

Even though substantial information have been gained on *Hox* gene regulation, a better comprehension of the controls governing *Hox* gene expression is needed to decipher the mechanistic basis responsible for *Hox* gene function in axial patterning. *Hox* gene regulation is thought to be achieved by a combination of strategies involving: (i) chromatin remodeling (12); (ii) global enhancer sequences located outside the cluster and acting in a relatively promoter-unspecific manner (30, 33, 55); and (iii) integrated regulation of neighbouring genes through the sharing, the competition and/or the selective use of defined local *cis*-acting sequences (23, 53; reviewed in 31). Extensive studies have been devoted to the identification of control elements demonstrating that *Hox* gene expression can be

recapitulated partly or entirely upon random integration in the genome of transgenes containing DNA regulatory elements (7, 10, 36, 45, 46, 48, 53, 61, 64). The common emerging picture is that the dynamic profile of *Hox* gene expression relies on the interpretation of positional information transduced by transcriptional factors interacting with both positive and repressive DNA sequences to restrict the enhancer activities to defined regional domains within specific expression boundaries (22, 44, 57). Among the upstream factors identified so far, *caudal*-related family members have emerged as key regulators (13, 19, 49, 62). The main evidence for Cdx proteins involvement in *Hox* regulation comes from the analysis of the targeted mutations of these homeodomain-containing proteins in mouse as they result in skeletal defects akin to those previously observed in *Hox* mutant mice (14, 58, 62). In *Cdx1*<sup>-/-</sup>, *Cdx2*<sup>+/-</sup> and *Cdx1*<sup>-/-</sup>; *Cdx2*<sup>+/-</sup> compound mutants, the posterior shift in *Hox* gene boundaries correlates with the transformations observed along the anterior-posterior axis. Moreover, potential Cdx binding sites are found within the *cis*-regulatory regions of several *Hox* genes (13, 47, 54, 58). Finally, recent data substantiate the view that Cdx proteins may act as integrators of multiple signaling pathways elicited by either retinoic acid, Wnt or Fibroblast growth factors (8, 9, 25, 27, 28, 37, 49, 50). Consequently, Cdx proteins likely convey positional information from these signals to *Hox* genes (38).

To fully understand the regulatory events governing *Hox* gene expression, we are studying the *Hoxa5* gene. This gene provides a good model system to decipher the regional control of *Hox* regulation as its loss-of-function mutation affects a well-defined subset of its axial expression domain (2, 29, 36). In the developing embryo, *Hoxa5* expression extends from the caudal end to the posterior myelencephalon in the neural tube, and to the prevertebra (pv) 3 in the axial skeleton. *Hoxa5* transcripts are also detected in the mesenchymal component of several organs, including trachea, lungs, stomach, intestine and kidneys (1, 2, 3, 5, 15, 21). Aside from morphological defects in foregut derivatives (1, 5, 40), the targeted disruption of the *Hoxa5* gene perturbs axial skeleton identity in a region confined between pv3 and 10, the most anterior domain of *Hoxa5* expression in the prevertebral column (2, 29). Several transcripts of 1.8, 5.0, 9.5 and 11 kb in length encompassing *Hoxa5* coding sequences originate from the use of different promoters and alternative splicing (29; Y. Coulombe and L. Jeannotte, unpublished data). As a result, the

global *Hoxa5* expression profile derives from the combination of the expression domains of all *Hoxa5* transcriptional units initiating from both the proximal and the distal promoters. The major 1.8 kb transcript, which encodes the Hoxa5 270 amino acid protein, is specifically expressed at high levels in the axial domain where the *Hoxa5* mutation exerts its effect (36).

The presence of complex and overlapping transcriptional units at the *Hoxa5* locus implies dispersed and shared regulatory regions in the cluster. This prompted us to characterize the regulatory elements directing *Hoxa5* developmental expression using a transgenic approach. *Cis*-acting sequences lying within an 11.1 kb genomic fragment can recapitulate the temporal expression and substantially reproduce the spatial pattern of the *Hoxa5* 1.8 kb transcript (36). Deletion analyses have revealed several DNA control elements, including a 604 bp brachial spinal cord enhancer (BSC) in 5' flanking sequences (45, 61), and a 2.1 kb mesodermal enhancer (MES) downstream of *Hoxa5* coding sequences, the latter being essential for paraxial and lateral plate mesoderm expression in the cervical and upper thoracic region (36). Additional regulatory sequences involved in *Hoxa5* lung and gut expression have also been identified near the *Hoxa4* gene (42). In pursuing the characterization of the MES sequence by deletion and mutational analyses, we present evidence that MES contains DNA elements that limit *Hoxa5* regional specific expression domain along the anterior-posterior axis, and that Cdx proteins can directly interact with MES sequences to correctly position the *Hoxa5* expression domain.

## MATERIALS AND METHODS

### Constructions of *Hoxa5/lacZ* transgenes

Construct 1 of this study, also named pLJ133, has been described previously (Fig. 2.1B; construct #9 in reference 36). It contains the bacterial *lacZ* gene inserted into the *SacI* site of the first exon of the *Hoxa5* gene, allowing translation of the *lacZ* open reading frame from the *Hoxa5* AUG. Construct 1 was digested with *HindIII* to remove a 2.08 kb fragment from +2.85 kb to +4.93 kb and self-ligated to produce an intermediate construct (pLJ143; not shown), containing a continuous *XhoI-HindIII Hoxa5* genomic fragment extending

from -235 bp to +2.85 kb that does not direct  $\beta$ -galactosidase expression as previously shown (64). Insertion of a *HindIII*-*PstI* fragment (from +2.85 kb to +4.60 kb) at the *HindIII* site (+2.85 kb) of pLJ143 resulted in construct 2. Constructs 3 to 5 were generated by a series of deletions at the 3' end of construct 1. Construct 1 was partially digested with *Eco47III* to produce construct 3, and with *AvrII* and *XhoI* to generate constructs 4 and 5, respectively. A 892 bp *XhoI/HindIII* filled-in fragment, extending from +4.04 kb to +4.93 kb, was inserted either at the *HindIII* (+2.85 kb) or at the *XhoI* site (-235 bp) of pLJ143 to generate constructs 6 and 7, respectively. Construct 8 was derived from construct 1 by deleting the *AvrII-Eco47III* sequence, thereafter referred to as AvEc-164 bp fragment, located between positions +4.28 kb and +4.44 kb. Construct 9 was obtained by cloning the AvEc-164 bp fragment into the *HindIII* (+2.85 kb) site of pLJ143. For constructs 10, 11 and 12, nucleotide substitutions in the identified consensus Cdx binding sites were produced by an overlapping PCR strategy using synthetic oligonucleotide primers containing appropriate base changes (63). The modifications introduced are indicated in Figure 2.4A. The 2.08 kb *HindIII* fragment extending from +2.85 kb to +4.93 kb was subcloned and the resulting construct was used as template for synthetic primers. All introduced mutations were subsequently validated by sequencing. The plasmids containing the desired mutations were digested with *HindIII*, and the fragments were subcloned into the *HindIII* site (+2.85 kb) of pLJ143 to generate constructs 10 (mut1), 11 (mut2) and 12 (mut1,2). All the constructs described in the present study were made in pBluescript SKII+ (Stratagene) and purified following a cesium chloride centrifugation.

### **Production and genotyping of transgenic mice**

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the institutional animal care committee. The *Hoxa5/lacZ* sequences from all constructs were isolated using a *KpnI-NotI* digestion to remove vector sequences and they were purified on agarose gel. They were then injected into the pronuclei of fertilized eggs derived from (C57BL/6 x C3H) F1 hybrid intercrosses following standard procedures (24). Transgenic founder embryos were recovered from foster mothers, genotyped by Southern analysis of yolk sac DNA using a *lacZ* specific probe to verify the integrity of the microinjected construct, and analyzed for *lacZ* expression by  $\beta$ -

galactosidase staining as previously described (36). Permanent mouse lines for construct 1 were also obtained and genotyped using tail DNA.

The effect of Cdx proteins on *Hoxa5/lacZ* transgene expression was assessed using either a *Cdx1* mutant mouse line originally produced in the laboratory of Dr. P. Gruss (58) and provided by Dr. D. Lohnes, or a *Cdx2* mutant mouse line generated in the laboratory of Dr. F. Beck and provided by Dr. K. Chawengsaksophak (14). The *Cdx1* and *Cdx2* mutations were maintained in the 129/SvEv and ICR genetic backgrounds, respectively. In addition to the pLJ133 established transgenic line (corresponding to construct 1 in the present study; 2.1B), a permanent mouse line obtained previously for the pLJ57 *Hoxa5/lacZ* construct was tested (construct #2 in reference 36). The pLJ57 transgene contains a *Hoxa5* genomic fragment extending from -2.13 kb to +7.19 kb with the *lacZ* reporter gene in the first exon of the gene. To generate *Cdx1* +/-; pLJ133 +/- and *Cdx1* +/-; pLJ57 +/- animals, breedings between *Cdx1* -/- and *Hoxa5/lacZ* mice were performed. *Cdx1* +/-; pLJ133 +/- and *Cdx1* +/-; pLJ57 +/- males were then bred with *Cdx1* +/- females to produce animals for all six possible genotypes. In parallel, pLJ133 +/- or pLJ57 +/- males were bred with *Cdx2* +/- females to generate animals for all four possible genotypes. The early embryonic lethality of *Cdx2* -/- mutants prevents the analysis of *Cdx2* -/- embryos carrying a *Hoxa5/lacZ* transgene (14). We also produced *Cdx1* +/-; pLJ57 +/- males that were bred with *Cdx1* +/-; *Cdx2* +/- females to evaluate the impact of three *Cdx* mutated alleles on *Hoxa5/lacZ* transgene expression (*Cdx1* -/-; *Cdx2* +/-; pLJ57 +/- specimens). The morning of vaginal plug detection was considered as E0.5. Embryos were obtained at various embryonic ages and stained for  $\beta$ -galactosidase activity. Yolk sac DNA was used for genotyping the *lacZ* and *Cdx1* alleles by Southern blot analysis (58). *Cdx2* genotype was determined by PCR as described in reference 62.

### **Electrophoretic mobility shift assays**

The expression vectors pSG5-*Cdx1*, pSG5-*Cdx2* and pSG5-*Cdx4* were provided by Dr. J. Deschamps (13). The TnT7 Quick coupled transcription/translation system (Promega Corporation) was used to produce *in vitro* each of the Cdx proteins that were then analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis and directly assayed for electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The AvEc-164 bp fragment was purified, end-labelled with T4



polynucleotide kinase, and tested for Cdx1, Cdx2 and Cdx4 binding by EMSA. A combination of double-stranded end labelled oligonucleotides covering (i) the 5' half of AvEc-164 bp fragment from nucleotides 1 to 86 (Fig. 2.3B), (ii) the 3' half of AvEc-164 bp fragment from nucleotides 67 to 164, and (iii) sequences encompassing Cdx binding sites, including 5'CCGGATTTAACTTTAGTCTTTGAAT3', 5'TTGAAAGGGGTAAAGCGCT3' and Oligo1 were also tested. We focused on two consensus Cdx binding sites, sites 1 and 2 present in Oligo1, that showed Cdx binding activity. EMSA was performed with double-stranded end labelled oligonucleotides harboring either the wild-type sequence 5'TGAAGCAATAAACTTTATGGCCGGA3' [Oligo1], or mutated binding sites 5'TGAAGCAATGCCCTTTATGGCCGGA3' [Oligo1 (mut1)], 5'TGAAGCAATAAACTTGCGGGCCGGA3' [Oligo1 (mut2)] and 5'TGAAGCAATGCCCTTGCGGGCCGGA3' [Oligo1 (mut1,2)]. Nucleotide substitutions are underlined. Binding reactions containing 0.5 to 4 ng of probe (100,000 cpm), 1 µl of Cdx protein, 1 µg of poly (dI-dC), 100 ng of yeast tRNA prepared in 15 mM Hepes pH 7.9, 50 mM NaCl, 80 µM ZnCl<sub>2</sub>, 800 µM DTT, 0.5% NP-40, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 3% Ficoll were equilibrated for 10 minutes at 25°C and separated by electrophoresis through a 6% polyacrylamide (29:1) gel containing 0.25X Tris-Borate-EDTA. The specificity of Cdx binding was assessed by addition of 100-fold excess of unlabeled probe prior to the addition of the radiolabeled probe. A 23 bp double-stranded DNA fragment of the sucrase-isomaltase promoter, SIF1 (5'GTGCAATAAACTTTATGAGTAA3'), that contains two sequences interacting with the Cdx2 protein, was used as a positive control and competitor for some binding assays (59, 60). Two unrelated double-stranded DNA fragments (TB2 and SP1) were also used as competitors. The sequence of the 97 bp double-stranded oligonucleotide TB2 used in the study is 5'TGGCAAACCGACCCCAACCTCTACACAAAGCCCAGAGGGGATACAAAGCCG GGGACCCGAAGTTGTTGTACCCGATTCTAAGTCACCACCTCCCCG3' and the sequence of the 22 bp double-stranded oligonucleotide SP1 used is 5'ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC3'.

### **Supershift assays**

E9.5 whole cell extract was prepared as described in (13). Binding reactions containing

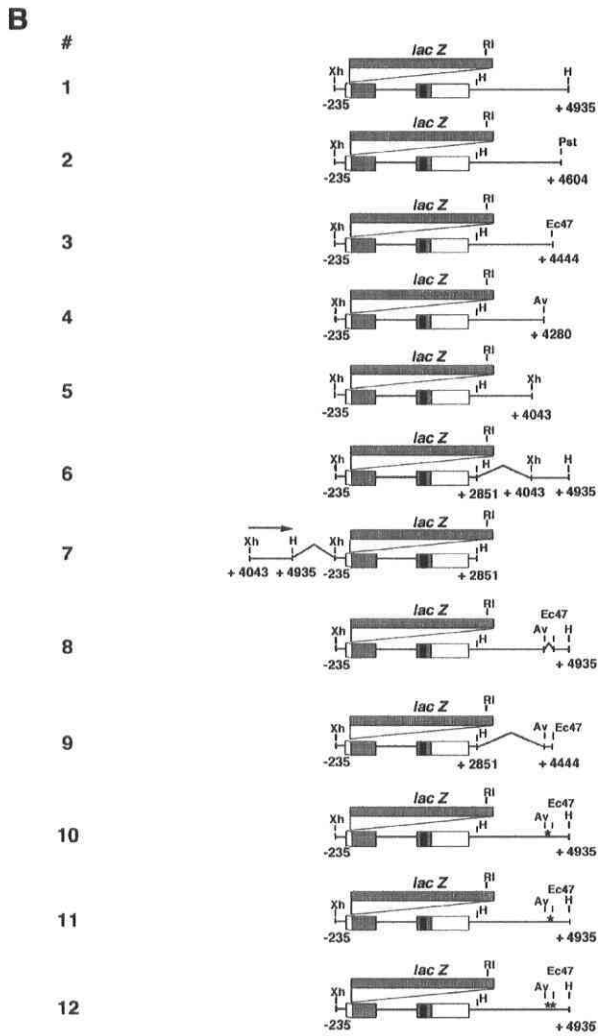
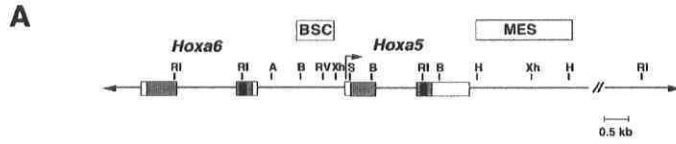
0.5 to 4 ng of probe (100,000 cpm), 20 mM Hepes pH8, 60 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, and 1 µg of poly (dI-dC) were incubated for 15 minutes at 25°C. The Cdx4 antibody (provided by Dr. C. Wright) was then added and the incubation continued for an additional 20 minutes at 25°C. The reaction products were separated by electrophoresis through a 6% polyacrylamide (29:1) gel containing 0.25X Tris-Borate-EDTA and 2.5% glycerol. The specificity of antibody binding was assessed by the use of a control antibody raised against skeletal muscle calsequestrin obtained from Dr. E. Lonergan. Supershift assays were also done with the Cdx1 and Cdx2 antibodies obtained from Dr. D. Lohnes.

## RESULTS

### Deletion analysis of the *Hoxa5* mesodermal enhancer (MES)

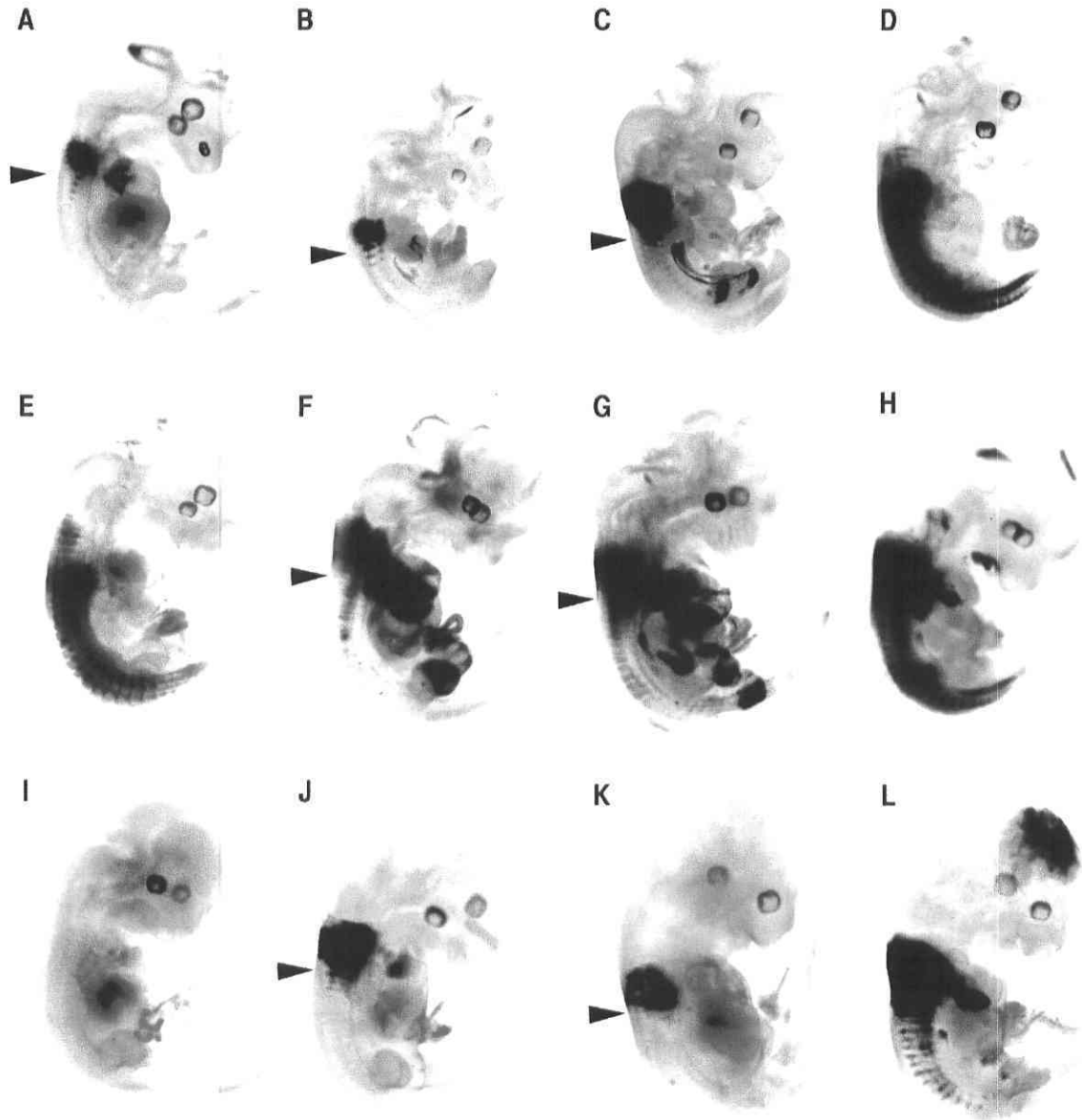
We previously identified a 5.17 kb DNA region encompassing the *Hoxa5* locus (construct 1, Fig. 2.1B) that can specifically direct expression in mesodermal derivatives of the cervical-upper thoracic domain (36). This sequence includes a 2.1 kb *Hind*III fragment (MES) possessing enhancer properties and localized downstream of *Hoxa5* coding sequences between positions +2.85 kb and +4.93 kb. In E12.5 F0 transgenic embryos carrying construct 1, β-galactosidase expression was detected in the prevertebral column between pv3 and pv10/11, with a stronger signal in the pv3-6 region (Fig. 2.2A; 36). The urogenital tract and the forelimb buds also expressed the transgene, in addition to the hindlimbs in a few specimens (not shown). No transgene expression was detected in the neural tube since the BSC enhancer element was not included in construct 1 (Fig. 2.1; 61).

Deletions of the MES fragment were made to delineate the DNA elements involved in tissue-specific expression and they were tested in E12.5 F0 transgenic embryos. Removal of 331 bp at the 3' end of the MES resulted in a pattern similar to that observed with construct 1, except for expression in the mesenchymal condensations of developing limb buds that was detected in only one transgenic embryo (construct 2; Figs. 2.1C, 2.2B; not shown). Deletion of an additional 160 bp resulted in a X-gal staining pattern comparable to that seen for constructs 1 and 2 (construct 3; Fig. 2.2C). Furthermore, staining in the limb



**C**

<i>lac Z</i> positive / No. of TG	Expression					
	neural tube	som/ pv	post. bound.	uro. tract	limbs	gut
7/14	0	7	5	3	4	0
5/12	0	5	5	4	1	0
8/14	0	7	5	8	6	5
8/24	0	7	0	0	1	1
8/19	0	7	2	0	0	0
9/12	0	9	9	0	9	6
8/12	0	8	8	5	8	7
5/21	0	5	2	4	3	0
0/31	not applicable					
6/12	0	6	4	2	2	1
7/14	0	7	5	4	2	2
8/18	0	8	0	5	4	3



buds was recovered for 6 out of 8 F0 expressing transgenic embryos (Fig. 2.1C). In concordance with the delay in the formation of embryonic posterior structures versus more anterior ones, the forelimb buds appeared fully stained whereas only the distal extremity of hindlimb buds, corresponding to the interdigital region, was positive. Construct 3 was also expressed in the gut of 5 F0 expressing transgenic embryos and in the urogenital tract of all expressing embryos (Figs. 2.1C, 2.2C).

When an extra 164 bp DNA fragment was removed from the 3' terminus of the MES (construct 4), all the F0 expressing embryos obtained showed a strong X-gal staining in the prevertebral column from the anterior limit at pv3 to the caudal end of the embryo, indicating that the posterior restriction at pv10 was lost (Figs. 2.1, 2.2D). This 3' deletion also led to the absence of reporter gene expression in the developing limb buds, the urogenital system and the gut for the majority of F0 expressing embryos suggesting the presence of tissue-specific regulatory elements in the *AvrII-HindIII* 655 bp sequence. We also performed an additional 3' deletion up to the *XhoI* site located at +4.04 kb that generated construct 5 (Fig. 2.1B). As for construct 4, most of the F0 expressing embryos expressed the transgene from pv3 down to the tail of the embryo (Fig. 2.2E). Furthermore, no transgene expression was detected in the urogenital tract, the limb buds and the gut (Fig. 2.1C). Taken together, these results indicated that the 3' half of the MES encompasses several *cis*-acting regulatory elements involved in specific regional control activities. The loss of posterior restriction along the prevertebral column also suggested that sequences between the *AvrII* (+4.28 kb) and *Eco47III* (+4.44 kb) restriction sites are involved in the positioning of the posterior boundary of expression at the upper thoracic level.

To further define the contribution of the 892 bp *XhoI-HindIII* DNA fragment to the MES activity, constructs carrying this DNA sequence either in 3' (construct 6; Fig. 2.1B) or in 5' (construct 7; Fig. 2.1B) of a *Hoxa5/lacZ* minimal construct were designed. This *Hoxa5/lacZ* minimal vector included 3.09 kb of *Hoxa5* genomic sequences from -235 bp to +2.85 kb that on its own cannot direct transgene expression (64). Constructs 6 and 7 presented a similar pattern of expression in the interdigital region and in the mesenchymal condensations along the proximo-distal axis of the limb buds and in the gut (Figs. 2.1C, 2.2F, G). Only F0 expressing embryos for construct 7 showed X-gal staining in the

urogenital tract (Fig. 2.1C). As constructs 1, 2 and 3, constructs 6 and 7 drove  $\beta$ -galactosidase expression in the cervical region of the prevertebral column with a well-established posterior limit in the upper thoracic region (Fig. 2.2F, G). The above results suggested that the *XhoI-HindIII* sequence was able to direct region-specific expression independently of its position relative to the *Hoxa5* promoter. However, the *XhoI-HindIII* fragment was unable to drive transgene expression when tested in front of a heterologous promoter (*hsp68/lacZ*; not shown), suggesting that the *Hox* genomic context was essential for the regulatory action of the 3' fragment of the MES region. These results also indicated that the genuine enhancer activity of the MES relies on its integrity.

### **Distinct MES regulatory sequences mediate *Hoxa5/lacZ* regional expression**

The 3' sequential deletion of the MES suggested that the AvEc-164 bp fragment contains DNA regulatory elements that restrict *Hoxa5/lacZ* transgene expression to the cervical-upper thoracic region along the axis. We directly tested this hypothesis by removing the 164 bp sequence from construct 1 to generate construct 8 (Fig. 2.1B). Deletion of the AvEc-164 bp fragment resulted in a loss of posterior restriction along the prevertebral column for 3 out of 5 F0 expressing transgenic embryos (Fig. 2.1C). Transgene expression was stronger in the cervical region but the extent of the loss of posterior restriction varied from embryo to embryo (Fig. 2.2H). The loss of posterior restriction was the only difference in expression between constructs 1 and 8 as both constructs drove *lacZ* gene expression in the urogenital system and the limb buds, but not in the gut (Figs. 2.1C, 2.2H). When linked to the *Hoxa5/lacZ* minimal vector (construct 9; Fig. 2.1B), the AvEc-164 bp fragment did not direct any reporter gene expression indicating no enhancer properties (Figs. 2.1C, 2.2I). Altogether, these data showed that the AvEc-164 bp fragment contains DNA elements that participate in the positioning of the posterior boundary of *Hoxa5* expression at the upper thoracic level along the axial skeleton.

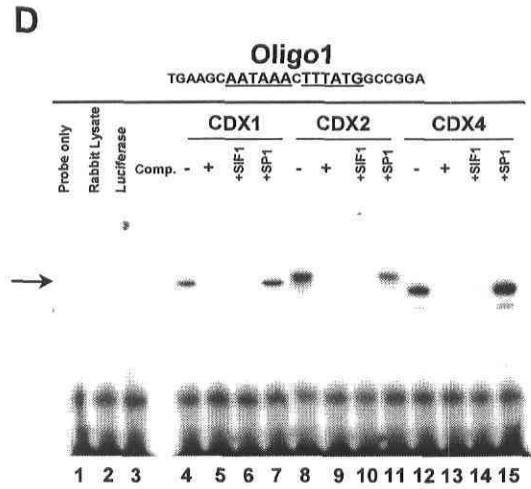
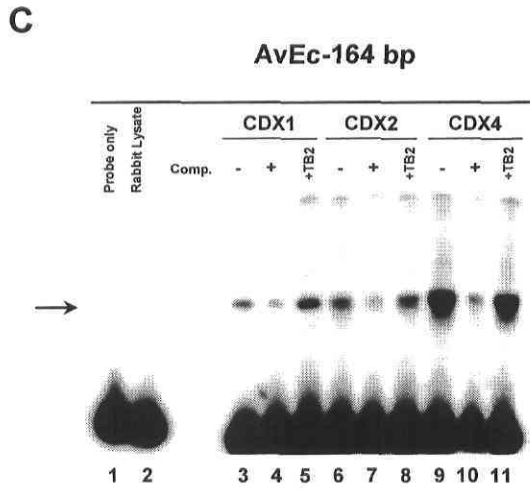
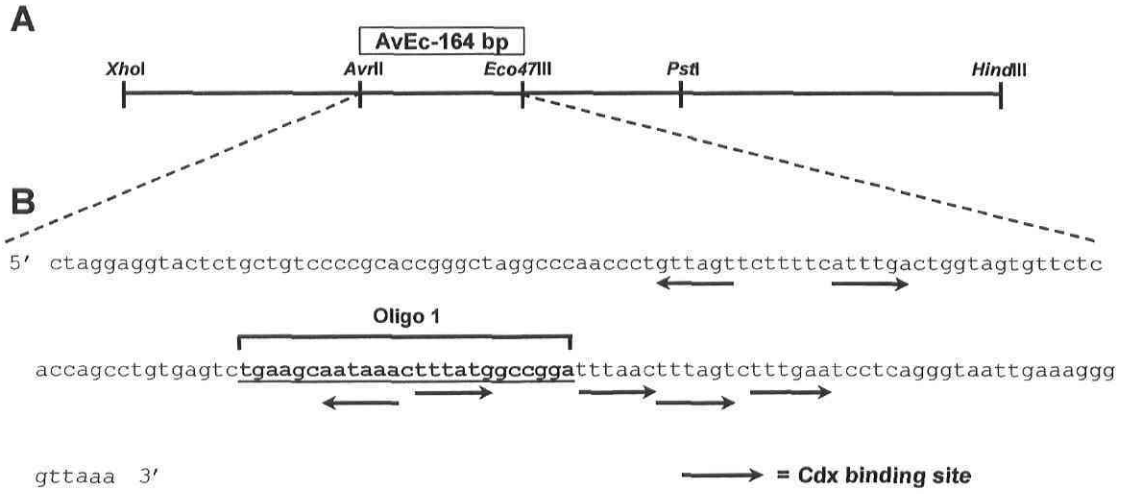
### ***Cdx* gene products bind *in vitro* to the *AvrII-Eco47III* 164 bp fragment**

To gain insight into critical sequences involved in axial regional specification, we investigated whether the AvEc-164 bp fragment contains binding sites for known *trans*-acting factors that could be involved in transducing positional information to *Hox* genes.

By sequence comparison with TFsearch database (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), we found, among several binding sites of putative *Hox* transcriptional regulators, seven potential sites with high homology to the consensus (T,T,T,A,T,A/G) for the *Cdx* gene products (Fig. 2.3B; 39, 52, 59). Sequence comparison of the surrounding *Hoxa5* genomic environment revealed that *Cdx* consensus binding sites were predominantly localized in the MES region, and the majority of these *Cdx* binding sites were confined in the 3' half of the AvEc-164 bp fragment (Fig. 2.3B). To establish whether *Cdx* proteins can bind the AvEc-164 bp fragment, EMSA were performed with the three murine *Cdx* proteins, *Cdx1*, *Cdx2* and *Cdx4*, produced *in vitro* (Fig. 2.3C). All three *Cdx* proteins formed binding complexes with the AvEc-164 bp fragment (Fig. 2.3C, lanes 3, 6, 9). Specificity of binding was confirmed by competition studies with a 100-fold excess of unlabeled probe that resulted in a substantial reduction of *Cdx* protein binding (Fig. 2.3C, lanes 4, 7, 10), and by addition of a 100-fold excess of an unrelated primer, TB2 (lanes 5, 8, 11). Further characterization of the specific interactions of *Cdx* proteins with each half of the AvEc-164 bp fragment revealed that *Cdx1*, *Cdx2* and *Cdx4* proteins bound specifically to the 3' half of the fragment. No complex with the 5' half of the AvEc-164 bp fragment was detected, despite the presence of two potential *Cdx* binding sites (not shown). To identify which sites from the 3' half region were involved in binding activity, synthetic oligonucleotides containing the potential *Cdx* binding sequences were tested with the three proteins in EMSA. We identified a 25 bp double-stranded oligonucleotide, named Oligo1 that spans two *Cdx* consensus sites, as the only target for *Cdx* protein binding (Fig. 2.3D, lanes 4, 8, 12). Indeed, the other three consensus sites for *caudal*-related proteins located in the 3' half of the AvEc-164 bp fragment did not form any complex with *Cdx* proteins (not shown). *Cdx* protein binding to Oligo1 was efficiently competed by addition of a 100-fold excess of unlabeled probe (Fig. 2.3D, lanes 5, 9, 13). Specificity of the interaction was further demonstrated by using as competitor SIF1, a 23 bp double-stranded DNA fragment of the sucrase-isomaltase promoter, previously shown to interact with *Cdx2* (Fig. 2.3D, lanes 6, 10, 14; 59). Finally, additional support for the specificity of the binding was provided by the addition of a 100-fold excess of an unrelated SP1 primer (Fig. 2.3D, lanes 7, 11, 15).

To compare the importance of each site in the formation of *Cdx*-Oligo1 complexes,





three nucleotide substitutions were introduced into Cdx binding sites 1 and 2 individually or in combination (Fig. 2.4A). While nucleotide substitutions in site 1 (mut1) or in site 2 (mut2) did not alter the binding of the three Cdx proteins to Oligo1 (Fig. 2.4B, lanes 2-4, 10-12, 14-16), their combined mutations (mut1,2) in Oligo1 abolished the formation of specific binding complexes (Fig. 2.4B, lanes 6-8).

To further establish the functional significance of the two Cdx binding sites, E12.5 F0 *Hoxa5/lacZ* transgenic embryos were produced to assess the effect on transgene expression of nucleotide substitutions at sites 1 and 2, either individually or in combination. These mutations were introduced into construct 1 to generate constructs 10, 11 and 12, respectively (Fig. 2.1B). Transgenic embryos for constructs 10 or 11 carrying individual mutation displayed the same regionally restricted expression pattern of *lacZ* staining as their cognate wild-type construct (Figs. 2.1C, 2.2A, J, K). Expression in the urogenital system, the developing limb buds and the gut was detected in some F0 expressing specimens (Fig. 2.1C). In contrast, all F0 expressing embryos carrying construct 12 with nucleotide substitutions in both binding sites presented a lack of posterior restriction along the prevertebral column (Figs. 2.1C, 2.2L). The X-gal staining was stronger in the cervical region and extended caudally. Altogether, these results indicated that the *Cdx* gene products can interact with the AvEc-164 bp fragment via two Cdx consensus binding sites confined within a 25 bp sequence and this interaction could participate *in vivo* in the positioning of a posterior boundary of expression in the upper thoracic region.

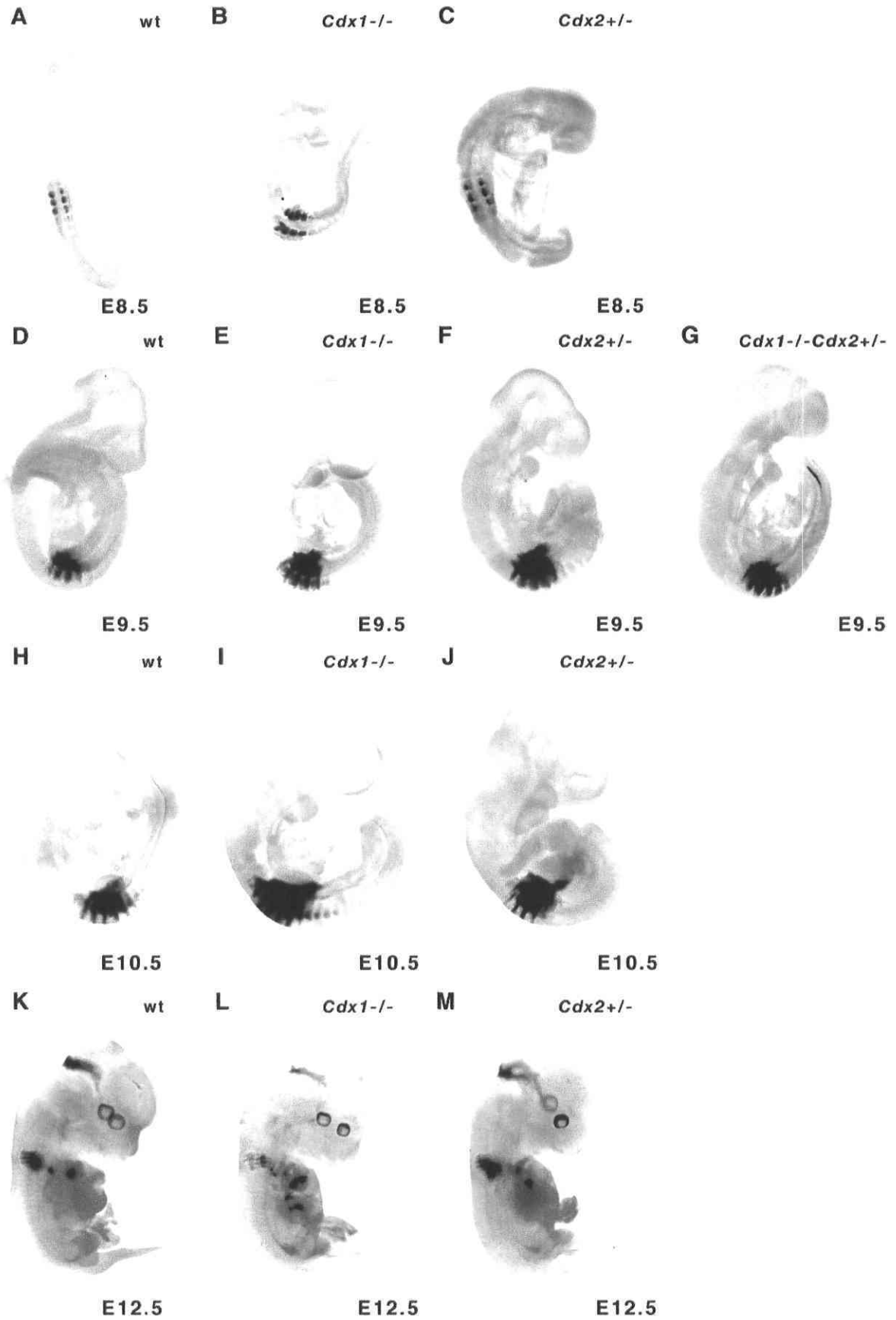
### ***Hoxa5/lacZ* transgene expression in *Cdx* mutant backgrounds**

Experimental data have shown that overexpression or loss-of-function of *Cdx* genes can affect *Hox/lacZ* transgene activity and directly regulates endogenous *Hox* gene expression upon interaction with Cdx binding sites in the flanking regions of *Hox* genes (13, 58, 62). To test the *in vivo* requirement of *Cdx1* or *Cdx2* gene function in the correct positioning of the *Hoxa5* expression domain, we verified if the expression of construct 1 could be altered in *Cdx1* or *Cdx2* mutant embryos. To do so, the pLJ133 *Hox/lacZ* transgene (corresponding to construct 1) was introduced into the *Cdx1* or *Cdx2* mutant background by successive breedings. E12.5 transgenic embryos carrying the *Hoxa5/lacZ*



transgene and either *Cdx1* or *Cdx2* mutant alleles were generated and stained for  $\beta$ -galactosidase activity. In *Cdx1* *+/+*; *pLJ133* *+/-* transgenic embryos, X-gal staining was detected in the forelimb buds, the urogenital tract and in the cervical region of the prevertebral column with a posterior limit at the upper thoracic level, similar to the staining obtained for construct 1 (Figs. 2.2A, 2.5K). The loss of *Cdx1* function did not affect the expression pattern of the transgene and no posterior shift of the caudal boundary along the prevertebral column could be observed for the majority of the specimens analyzed in the cohort (*Cdx1* *-/-*; *pLJ133* *+/-*; Fig. 2.5L). Although the early embryonic lethality precludes the analysis of *Cdx2* *-/-* mutants, the loss of one *Cdx2* allele causes alterations in vertebral identity at anterior thoracic and posterior cervical levels (14). *Cdx2* *+/-*; *pLJ133* *+/-* embryos displayed a *lacZ* staining profile similar to that of control and *Cdx1* *-/-*; *pLJ133* *+/-* specimens (Fig. 2.5M), suggesting that the lack of both *Cdx1* alleles or one *Cdx2* allele does not affect the regional expression of construct 1.

Construct 1 can direct  $\beta$ -galactosidase activity in a narrow window of time from E11 to E13 (J. Lapointe and L. Jeannotte, unpublished data). To assess the effect of the *Cdx1* and *Cdx2* mutations on the expression pattern of *Hoxa5/lacZ* transgene at earlier stages of embryogenesis, we introduced the pLJ57 transgene into both *Cdx* mutant backgrounds. The pLJ57 construct allows *lacZ* expression from E8.0-8.25 onwards, reproducing the endogenous temporal expression of the *Hoxa5* gene (36). E8.5, E9.5 and E10.5 transgenic embryos carrying both the pLJ57 transgene and the *Cdx1* or *Cdx2* mutant alleles were analyzed. As reported for *Cdx* mutant embryos carrying the pLJ133 transgene, we did not detect noticeable variation in pLJ57 regional expression in the cohorts of *Cdx1* *-/-*; *pLJ57* *+/-* and *Cdx2* *+/-*; *pLJ57* *+/-* specimens at all embryonic ages analyzed (Fig. 2.5A-F, H-J). As functional redundancy between *Cdx1* and *Cdx2* genes can occur in *Hox* gene regulation (62), we also introduced the pLJ57 transgene into the *Cdx1* *-/-*; *Cdx2* *+/-* mutant background. As shown at E9.5, no alteration of the transgene expression profile was noticed in *Cdx1* *-/-*; *Cdx2* *+/-*; *pLJ57* *+/-* embryos (Fig. 2.5G). Examination of the *Hoxa5* endogenous expression pattern failed also to reveal any changes in *Cdx1* *-/-* embryos, thus validating the transgene expression studies (not shown). Taken together, these results indicated that the loss of *Cdx1* function, the *Cdx2* haploinsufficiency or the combination of both does not perturb the regional expression of the *Hoxa5* gene

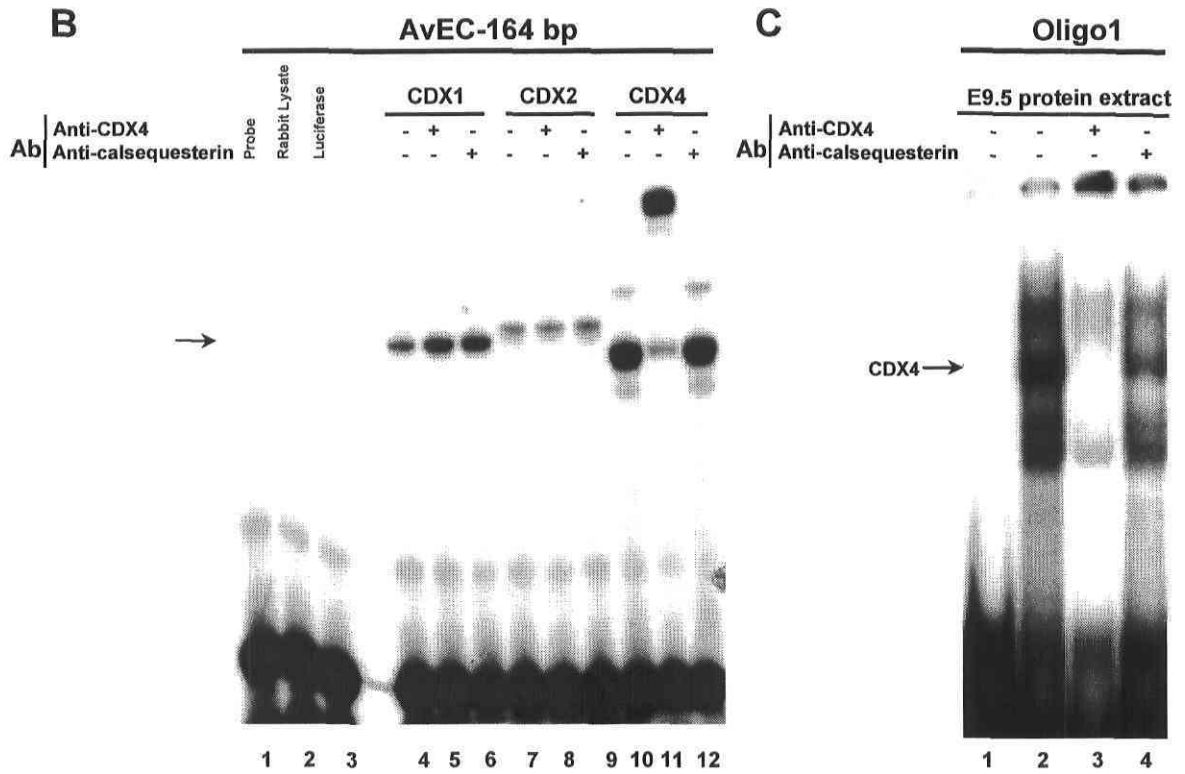
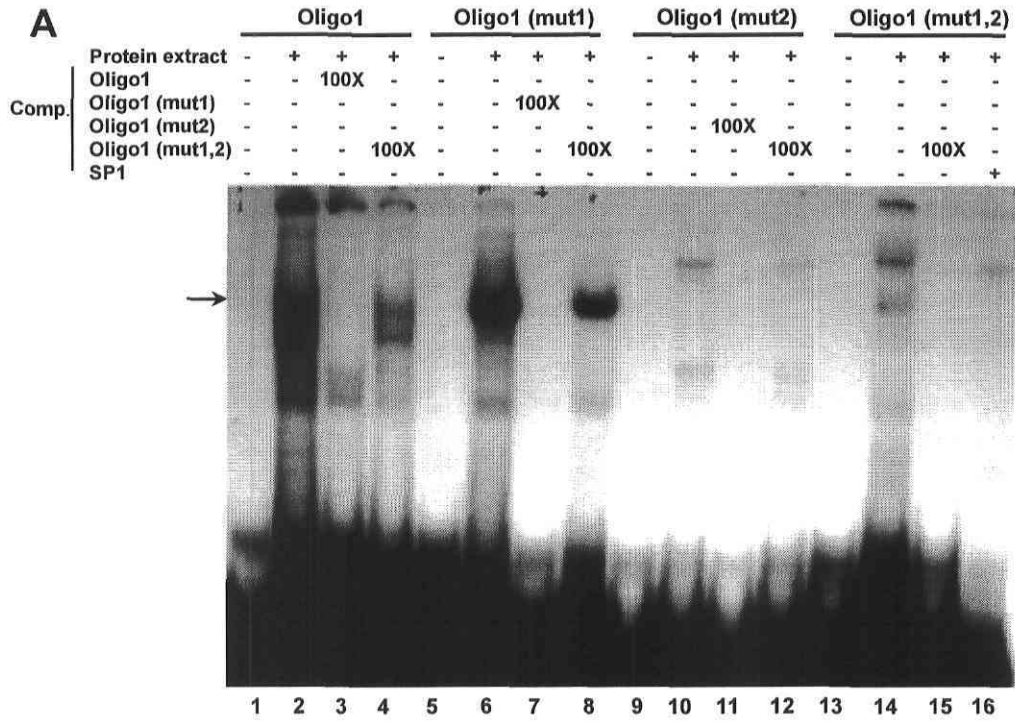


along the prevertebral column.

### **Cdx4-containing embryonic protein extracts form complexes with Oligo1**

The lack of genetic evidence supporting the involvement of *Cdx1* and *Cdx2* genes in the control of *Hoxa5* regional expression led us to evaluate if the third member, *Cdx4*, could be implicated in *Hoxa5* gene regulation. As no *Cdx4* mutant mouse line has been reported, we used a biochemical approach. First, we tested whether the *Cdx* gene products present in the embryo possessed the ability to bind the Oligo1 sequence. We performed EMSA using E9.5 embryo protein extract and Oligo1, Oligo1 (mut1), Oligo1 (mut2) and Oligo1 (mut1,2) as probes (Fig. 2.6A). Proteins present in the extract were able to bind Oligo1, Oligo1 (mut1) and Oligo1 (mut2) (Fig. 2.6A, lanes 2, 6, 10). In the latter, the different shift pattern suggested that other proteins can bind this mutated form. Specificity of binding was confirmed by competition studies with a 100-fold excess of unlabeled probe that resulted in the abolition of protein binding (Fig. 2.6A, lanes 3, 7, 11). Moreover, addition of a 100-fold excess of unlabeled Oligo1 (mut1,2) was unable to efficiently compete protein binding (Fig. 2.6A, lanes 4, 8, 12), suggesting that proteins from the embryo extract bind specifically Oligo1 via the two Cdx binding sites identified. EMSA with Oligo1 (mut1,2) produced a specific pattern of bands revealing that different proteins can bind Oligo1 (mut1,2) (Fig. 2.6A, lane 14). This specificity of binding was confirmed by competition with a 100-fold excess of Oligo1 (mut1,2) unlabeled probe demonstrating that these proteins were indeed different from those binding Oligo1 (Fig. 2.6A, lane 15). The specificity of binding was also assessed by addition of a 100-fold excess of SP1 binding site (Fig. 2.6A, lane 16).

To test if the E9.5 embryo protein complexes that bound Oligo1 sequence contained Cdx proteins, supershift EMSA were performed using E9.5 embryo protein extract, Oligo1 and Cdx specific antibodies. The specificity of each anti-Cdx antibody was assessed by EMSA with the different Cdx proteins produced *in vitro*, as shown for the anti-Cdx4 antibody (Fig. 2.6B, lanes 5, 8, 11). Addition of the anti-Cdx4 antibody to the embryo protein extract-Oligo1 reaction led to a near-complete loss in the most abundant Oligo1-protein complex (Fig. 2.6C, lanes 2, 3). This could be caused either by inhibition of stable DNA-protein complex formation following antibody binding or by the strong alteration of the





electrophoretic mobility of the DNA-protein-antibody complex. Such a result was not observed when anti-Cdx1, anti-Cdx2 or control antibodies (anti-calsequestrin) were used (Fig. 2.6C, lane 4; not shown). Taken together, these results demonstrate that Cdx4 present in E9.5 embryo protein extract can bind specifically Oligo1 sequence. Thus, Cdx4 appears as a potential regulator for the correct positioning of the posterior boundary of *Hoxa5* expression in the upper thoracic region along the axial skeleton.

## DISCUSSION

### MES sequence directs *Hoxa5* expression in several structures

The correct development of structures from the cervical and upper thoracic axial level necessitates proper control of *Hoxa5* gene expression. To define the mechanisms involved, we have refined our analysis of the MES region. In addition to direct expression in the skeleton at this axial level, the MES sequence encloses DNA elements in its 3' half able to target transgene expression in the limb buds and in the urogenital and intestinal tracts (Fig. 2.1). Although the present work did not focus on the delimitation of these tissue-specific elements, insights can be gained from our deletion analysis. For instance, gut expression seems to result from the equilibrium between positive and negative sequences, located between the *AvrII* (+4.28 kb) and *Eco47III* (+4.44 kb), and the *Eco47III* (+4.44 kb) and *HindIII* (+4.93 kb) restriction sites, respectively. Additional *cis*-acting sequences located in the proximity of the *Hoxa4* gene are also required for gut expression suggesting the coordinated action of several regulatory elements (42). As for the urogenital tract, we can infer that a combination of DNA elements, including the AvEc-164 bp fragment, is required for expression in this organ system. Control of limb bud expression also implicates interspersed elements in the *XhoI* (+4.04 kb) and *HindIII* (+4.93 kb) region. Our analysis clearly demonstrates that coordination between several *cis*-acting regulatory elements is needed to fully reproduce the correct spatial and temporal *Hoxa5* gene profile. Further work will be needed to finely map these additional regulatory sequences.

### Positioning of *Hoxa5* posterior boundary depends on MES sequences

Definition of adequate boundaries is indispensable for proper *Hox* gene action. The functional limits of *Hoxa5*, as delineated by the axial skeletal phenotype of *Hoxa5* mutant mice, are restricted to the pv3-10 region (2, 29). Specific expression in this domain can be driven by the 892 bp *XhoI-HindIII* DNA fragment (constructs 6 and 7; Figs. 2.1, 2.2). Posterior restriction at the pv10 level is further delimited by the AvEc-164 bp fragment, enclosed within the *XhoI-HindIII* fragment, that acts as a repressor. We have shown that the pv3-10 region corresponds to the specific expression domain of the 1.8 kb transcript (36). This transcript is also the sole *Hoxa5* transcript expressed in the mesenchyme of several structures affected by the mutation at this axial level, such as the respiratory tract, the thyroid gland and the pectoral girdle (1, 2, 6, 40). As this transcript is likely to encode the functional form of the *Hoxa5* gene, its expression domain must be tightly regulated. The transgenes used in the present study reflect the regulation of the proximal promoter from which the 1.8 kb transcript is produced as the distal promoter, residing in the vicinity of the *Hoxa7* gene and responsible for the transcription of the larger forms, is not included in the constructs (Y. Coulombe and L. Jeannotte, unpublished data). Consequently, this approach provides us with a useful means to elucidate the regulatory mechanisms governing *Hoxa5* regional expression in its functional domain.

As proposed by Kmita and Duboule (31), axial patterning relies upon a given partition of *Hox* functional domains along the developing anterior-posterior axis. The concept of posterior prevalence states that posteriorly expressed *Hox* genes functionally prevail over more anterior genes. Hence, the functional readout of the *Hox* overlapping transcription domains may reflect the prominent function of the most caudal *Hox* protein produced in a particular region (16). Several strategies may be envisaged to explain the suppressive mechanism by which a posterior *Hox* gene imposes its functional dominance (31). In the present case, a transcription-based partition of *Hoxa5* gene function may account for the restriction of the functional domain to the pv3-10 area. Thus, the control provided by the AvEc-164 bp fragment could be an important regulatory event in cervicothoracic axial specification through the constraint of *Hoxa5* expression domain. The *Hoxb5* gene also displays a pattern of expression that represents the sum of multiple *Hoxb5* transcripts (34). The *Hoxb5* mutation exerts its effect in the anterior-most expression domain of the gene, a region where the *Hoxb5* protein is specifically found (51, 53). One may speculate that the

*Hoxb5* gene expression is transcriptionally regulated similarly to its paralog *Hoxa5* and that the *Hoxb5* protein expression domain reflects the distribution of the *Hoxb5* major transcript. On the other hand, post-transcriptional events whereby a *Hox* transcript is selectively destabilized in posterior domain may be used to confine *Hox* gene expression as demonstrated for the *Hoxb4* gene (11). These strategies may co-exist, but we do not have evidence that post-transcriptional control occurs in *Hoxa5* spatial regulation (S. Tabariès and L. Jeannotte, unpublished data). While much emphasis was given to the regulation of the establishment and maintenance of the anterior boundary of expression (e.g. 17, 22, 32, 46), our present work underscores the importance of defining posterior boundaries as well.

### ***Cdx* gene products participate in the restriction of *Hox* gene expression**

*caudal*-related genes are involved in anterior-posterior patterning by regulating members of the *Hox* gene family in various species (13, 18, 26, 28, 41, 58). Our demonstration that *Cdx* proteins physically interact with *Hoxa5* regulatory sequences and that they likely participate in the definition of *Hoxa5* functional domain further confirms the importance of *Cdx* genes in axial patterning via *Hox* gene regulation. While *Cdx* proteins are mainly recognized for their role as positive regulators of *Hox* gene expression (13, 58, 62), our data show that murine *Cdx* proteins may also act to restrict *Hox* gene expression. This was also shown to be the case in *Drosophila* where *caudal* acts as a repressor of the *Abd-B* homeotic gene during anailia structure formation (43). Moreover, the fact that *Xcad* overexpression in *Xenopus* embryos leads to the repression of anterior *Hox* genes while posterior *Hox* genes exhibit more anterior expression substantiates the notion of a repressive function for *Cdx* proteins (19, 28). Taken together, these data suggest that *caudal*-related gene products possess a dual function of posterior-promoting/anterior-suppressing activity of *Hox* gene expression, as proposed by Isaacs and coll. (28). This dual role would allow *Cdx* proteins to modulate differentially the expression of subsets of *Hox* genes resulting in the definition of specific *Hox* functional domains that in turn would set up the correct posterior development of the organism. For *Hoxa5*, the binding of *Cdx* proteins to the AvEc-164 bp fragment would preclude its action posterior to the pv10 limit. However, *Hoxa5* posterior restriction also depends on other regulators since the mutation of both *Cdx* binding sites do not result in a gain of posterior expression of the transgene that was as strong and as distal as that

obtained for some of the deletions tested (construct 12 versus constructs 4, 5 or 8; Fig. 2.2D, E, H, L). Recent data also support the notion that additional sequences located in the 3' extremity of the MES region may cooperate with the AvEc-164 bp fragment in *Hoxa5* regional expression (S. Tabariès and L. Jeannotte, unpublished data). Finally, as Cdx proteins may act as an intermediate of retinoic acid, Wnt and Fibroblast growth factors (38), it remains to be defined if these signaling molecules impinge on the correct setting of *Hoxa5* functional boundaries via Cdx transduction.

Despite the fact that the three murine Cdx proteins possess the ability to bind *in vitro* the *Hoxa5* AvEc-164 bp fragment, Cdx4 emerges as the potential *in vivo trans*-acting factor in *Hoxa5* regulation. Cdx4 protein was also shown to regulate *Hoxb8* expression (13). Cdx1 and Cdx2 proteins can likely be excluded from *Hoxa5* regulation based on biochemical and genetic evidence. The absence of modification of the *Hoxa5* expression pattern along the prevertebral column of single or compound *Cdx1* and *Cdx2* mutants was unanticipated considering that the homeotic transformations observed in *Cdx* mutants encompass the functional domain of *Hoxa5*. However, although similarities exist between some of the skeletal transformations seen in *Hoxa5* and *Cdx* mutants, most of the vertebrae affected do not display the same type of transformation. For instance, the predominant homeotic defect observed in *Hoxa5* mutant mice is the posteriorization of the 7<sup>th</sup> cervical vertebra (C7) into a thoracic one. In contrast in *Cdx* mutants, C7 adopts a C6 identity (2, 14, 29, 58, 62). Moreover in *Cdx2* heterozygous specimens, we cannot exclude the possibility that enough Cdx2 protein remains to insure proper *Hoxa5* regulation. Unfortunately, to our knowledge, no *Cdx4* mutant mouse line is available to genetically address the importance of *Cdx4* in *Hoxa5* gene regulation.

The three Cdx proteins are expressed in the embryo following a gradient with a posterior maximum (38). Of these, *Cdx4* is the most posteriorly expressed and its expression ceases at E10.5 (20). Construct 1 and its derivatives do not reproduce the temporal expression pattern of the *Hoxa5* endogenous gene as they direct expression in a narrow time frame from E11 to E13 (64; J. Lapointe and L. Jeannotte, unpublished data). Therefore, the X-gal staining pattern observed in E12.5 F0 transgenic embryos is likely due to an earlier regulatory event directed by Cdx4. Indeed, *in vivo* detection of Cdx4 protein binding

occurred with E9.5 embryo extract but not with specimens from older ages. Altogether, this suggests that *Cdx4* may be involved in the establishment of the correct *Hoxa5* posterior boundary at the upper thoracic level.

In summary, our work gives insights into the mechanisms by which *Cdx* proteins, most likely *Cdx4*, directly participate to the posterior delimitation of the *Hoxa5* functional domain. The data favour the view that a transcription-based partition of *Hox* gene function might be a strategy in the establishment of the posterior prevalence in the specification of the cervical-upper thoracic axial level.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. J. Aubin, J. Charron and C. Séguin for helpful comments on the manuscript, and M. Lemieux for technical assistance. We are also grateful to Dr. J. Deschamps for providing *Cdx* plasmids, Drs. P. Gruss and D. Lohnes for the *Cdx1* mutant mouse line, Drs. F. Beck and K. Chawengsaksophak for the *Cdx2* mutant mouse line, and to Drs. E. Lonergan, C. Wright and D. Lohnes for the calsequestrin, *Cdx4*, and *Cdx1* and *Cdx2* antibodies, respectively. This work was supported by a grant from the National Institutes of Health (RO1-HD38463 to L. J. and C. K. T.). L. J. holds a Chercheur National Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## REFERENCES

1. **Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Bérard, J., and L. Jeannotte.** 1997. Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev. Biol.* **192**: 432-445.
2. **Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Behringer, R. R., and L. Jeannotte.** 1998. Transcriptional interferences at the *Hoxa4/Hoxa5* locus: importance of correct *Hoxa5* expression for the proper specification of the axial skeleton. *Dev. Dyn.* **212**: 141-156.
3. **Aubin, J., Chailier, P., Ménard, D., and L. Jeannotte.** 1999. Loss of *Hoxa5* gene function in mice perturbs intestinal maturation. *Am. J. Physiol.* **277**: C965-C973.
4. **Aubin, J., and L. Jeannotte.** 2001. Implication des gènes *Hox* dans les processus d'organogenèse chez les mammifères. *Médecine/Science* **17**: 54-62.
5. **Aubin, J., Déry, U., Lemieux, M., Chailier, P., and L. Jeannotte.** 2002. Stomach regional specification requires *Hoxa5*-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development* **129**: 4075-4087.
6. **Aubin, J., Lemieux, M., Moreau, J., Lapointe, J., and L. Jeannotte.** 2002. Cooperation of *Hoxa5* and *Pax1* genes during formation of the pectoral girdle. *Dev. Biol.* **244**: 96-113.
7. **Behringer, R. R., Crotty, D. A., Tennyson, V. M., Brinster, R. L., Palmiter, R. D., and D. J. Wolgemuth.** 1993. Sequences 5' of the homeobox of the *Hox-1.4* gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development* **117**: 823-833.
8. **Bel-Vialar, S., Itasaki, N., and R. Krumlauf.** 2002. Initiating *Hox* gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the *HoxB* genes in two distinct groups. *Development* **129**: 5103-5115.

9. **Béland, M., Pilon, N., Houle, M., Oh, K., Sylvestre, J.-R., Prinós, P., and D. Lohnes.** 2004. *Cdx1* autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 5028-5038.
10. **Bradshaw, M. S., Shashikant, C. S., Belting, H.-G., Bollekens, J. A., and F. H. Ruddle.** 1996. A long-range regulatory element of *Hoxc8* identified by using pCluster vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2426-2430.
11. **Brend, T., Gilthorpe, J., Summerbell, D., and P. W. Rigby.** 2003. Multiple levels of transcriptional and post-transcriptional regulation are required to define the domain of *Hoxb4* expression. *Development* **130**: 2717-2728.
12. **Chambeyron, S., and W. A. Bickmore.** 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the *HoxB* locus upon induction of transcription. *Genes Dev.* **18**: 1119-1130.
13. **Charité, J., de Graaff, W., Consten, D., Reijnen, M. J., Korving, J., and J. Deschamps.** 1998. Transducing positional information to the *Hox* genes: critical interaction of *cdx* gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* **125**: 4349-4358.
14. **Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F., and F. Beck.** 1997. Homeosis and intestinal tumours in *Cdx2* mutant mice. *Nature* **386**: 84-87.
15. **Dony, C., and P. Gruss.** 1987. Specific expression of the *Hox1.3* homeo box gene in murine embryonic structures originating from or induced by the mesoderm. *EMBO J.* **6**: 2965-2975.
16. **Duboule, D., and G. Morata.** 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* **10**: 358-364.
17. **Dupé, V., Davenne, M., Brocard, J., Dollé, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., and F. M. Rijli.** 1997. *In vivo* functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**: 399-410.



18. **Ehran, L. A., and K. E. Yutzey.** 2001. Anterior expression of the *caudal* homologue *cCdx-B* activates a posterior genetic program in avian embryos. *Dev. Dyn.* **221**: 412-421.
19. **Epstein, M., Pillemer, G., Yelin, R., Yisraeli, J. K., and A. Fainsod.** 1997. Patterning of the embryo along the anterior-posterior axis: the role of the caudal genes. *Development* **124**: 3805-3814.
20. **Gamer, L. W., and C. V. Wright.** 1993. Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila caudal* gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* **43**: 71-81.
21. **Gaunt, S. J., Coletta, P. L., Pravtcheva, D., and P. T. Sharpe.** 1990. Mouse *Hox-3.4*: homeobox sequence and embryonic expression patterns compared with other members of the *Hox* gene network. *Development* **109**: 329-339.
22. **Gérard, M., Chen, J. Y., Gronemeyer, H., Chambon, P., Duboule, D., and J. Zakany.** 1996. *In vivo* targeted mutagenesis of a regulatory element required for positioning the *Hoxd-11* and *Hoxd-10* expression boundaries. *Genes Dev.* **10**: 2326-2334.
23. **Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R. A., and R. Krumlauf.** 1997. Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping *Hox* expression patterns. *Genes Dev.* **11**: 900-913.
24. **Hogan, B., Beddington, R. S., Constantini, F., and E. Lacy.** 1994. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
25. **Houle, M., Sylvestre, J. R., and D. Lohnes.** 2003. Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function *in vivo*. *Development* **130**: 6555-6567.
26. **Hunter, C. P., Harris, J. M., Maloof, J. N., and C. Kenyon.** 1999. *Hox* gene expression in a single *Caenorhabditis elegans* cell is regulated by a caudal homolog and intercellular signals that inhibit wnt signaling. *Development* **126**: 805-814.

27. **Ikeya, M., and S. Takada.** 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.* **193**: 27-33.
28. **Isaacs, H. V., Pownall, M. E., and J. M. Slack.** 1998. Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *EMBO J.* **17**: 3413-3427.
29. **Jeannotte, L., Lemieux, M., Charron, J., Poirier, F., and E. J. Robertson.** 1993. Specification of axial identity in the mouse: role of the *Hoxa-5* (*Hox1.3*) gene. *Genes Dev.* **7**: 2085-2096.
30. **Kmita, M., Fraudeau, N., Hérault, Y., and D. Duboule.** 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of *Hoxd* genes in limbs. *Nature* **420**: 145-150.
31. **Kmita, M., and D. Duboule.** 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* **301**: 331-333.
32. **Knittel, T., Kessel, M., Kim M. H., and P. Gruss.** 1995. A conserved enhancer of the human and murine *Hoxa-7* genes specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* **121**: 1077-1088.
33. **Kondo, T., and D. Duboule.** 1999. Breaking colinearity in the mouse *HoxD* complex. *Cell* **97**: 407-417.
34. **Krumlauf, R., Holland, P. W. H., McVey, J. H., and B. L. M. Hogan.** 1987. Developmental and spatial patterns of expression of the mouse homeobox gene *Hox2.1*. *Development* **99**: 603-617.
35. **Krumlauf, R.** 1994. *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* **78**: 191-201.
36. **Larochelle, C., Tremblay, M., Bernier, D., Aubin, J., and L. Jeannotte.** 1999. Multiple cis-acting regulatory regions are required for restricted spatio-temporal *Hoxa5* gene expression. *Dev. Dyn.* **214**: 127-140.

37. **Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B. I., Freund, J. N., and R. Kemler.** 2000. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* **127**: 3805-3813.
38. **Lohnes, D.** 2003. The *Cdx1* homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *BioEssays* **25**: 971-980.
39. **Margalit, Y., Yarus, S., Shapira, E., Gruenbaum, Y., and A. Fainsod.** 1993. Isolation and characterization of target sequences of the chicken *CdxA* homeobox gene. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4915-4922.
40. **Meunier, D., Aubin, J., and L. Jeannotte.** 2003. Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in *Hoxa5* mutant mice. *Dev. Dyn.* **227**: 367-378.
41. **Mlodzik, M., Gibson, G., and W. J. Gehring.** 1990. Effects of ectopic expression of *caudal* during *Drosophila* development. *Development* **109**: 271-277.
42. **Moreau, J., and L. Jeannotte.** 2002. Sequence analysis of a *Hoxa4-Hoxa5* intergenic region including shared regulatory elements. *DNA Sequence* **13**: 203-209.
43. **Moreno, E., and G. Morata.** 1999. *Caudal* is the *Hox* gene that specifies the most posterior *Drosophila* segment. *Nature* **400**: 873-877.
44. **Morrison, A., Ariza-McNaughton, L., Gould, A., Featherstone, M., and R. Krumlauf.** 1997. *HOXD4* and regulation of the group 4 paralog genes. *Development* **124**: 3135-3146.
45. **Nowling, T., Zhou, W., Krieger, K. E., Larochelle, C., Nguyen-Huu, M. C., Jeannotte, L., and Tuggle, C. K.** 1999. *Hoxa5* gene regulation: A gradient of binding activity to a brachial spinal cord element. *Dev. Biol.* **208**: 134-146.
46. **Oosterveen, T., Niederreither, K., Dollé, P., Chambon, P., Meijlink, F., and J. Deschamps.** 2003. Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' *Hoxb* genes in posterior hindbrain. *EMBO J.* **22**: 262-269.

47. **Papenbrock, T., Peterson, R. L., Lee, R. S., Hsu, T., Kuroiwa, A., and A. Awgulewitsch.** 1998. Murine *Hoxc-9* gene contains a structurally and functionally conserved enhancer. *Dev. Dyn.* **212**: 540-547.
48. **Pöpperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S. K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R. S., and R. Krumlauf.** 1995. Segmental expression of *Hoxb-1* is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell* **81**: 1031-1042.
49. **Pownall, M. E., Tucker, A. S., Slack, J. M., and H. V. Isaacs.** 1996. eFGF, *Xcad3* and *Hox* genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* **122**: 3881-3892.
50. **Prinos, P., Joseph, S., Oh, K., Meyer, B. I., Gruss, P., and D. Lohnes.** 2001. Multiple pathways governing *Cdx1* expression during murine development. *Dev. Biol.* **239**: 257-269.
51. **Rancourt, D. E., Tsuzuki, T., and M. R. Capecchi.** 1995. Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev.* **9**: 108-122.
52. **Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H., and H. Jackle.** 1995. Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* **376**: 253-256.
53. **Sharpe, J., Nonchev, S., Gould, A., Whiting, J., and R. Krumlauf.** 1998. Selectivity, sharing and competitive interactions in the regulation of *Hoxb* genes. *EMBO J.* **17**: 1788-1798.
54. **Shashikant, C. S., Bieberich, C. J., Belting, H. G., Wang, J. C., Borbely, M. A., and F. H. Ruddle.** 1995. Regulation of *Hoxc-8* during mouse embryonic development: identification and characterization of critical elements involved in early neural tube expression. *Development* **121**: 4339-4347.
55. **Spitz, F., Gonzalez, F., and D. Duboule.** 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the *HoxD* cluster. *Cell* **113**: 405-417.

56. **Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L., and M. Kessel.** 1996. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech. Dev.* **55**: 91-108.
57. **Studer, M., Pöpperl, H., Marshall, H., Kuroiwa, A., and R. Krumlauf.** 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of *Hoxb-1*. *Science* **265**: 1728-1732.
58. **Subramanian, V., Meyer, B. I., and P. Gruss.** 1995. Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of *Hox* genes. *Cell* **83**: 641-653.
59. **Suh, E., Chen, L., Taylor, J., and P. G. Traber.** 1994. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7340-7351.
60. **Taylor, J. K., Levy, T., Suh, E. R., and P. G. Traber.** 1997. Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2293-2300.
61. **Tuggle, C. K., Zakany, J., Cianetti, L., Peschle, C., and M. C. Nguyen-Huu.** 1990. Region-specific enhancers near two mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes Dev.* **4**: 180-189.
62. **van den Akker, A. E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B. I., and J. Deschamps.** 2002. *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* **129**: 2181-2193.
63. **Wang, W., and B. A. Malcolm.** 1999. Two-stage PCR protocol allowing introductions of multiple mutation deletions and insertions using quick-change site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **26**: 680-682.
64. **Zakany, J., Tuggle, C. K., Patel, M. D., and M. C. Nguyen-Huu.** 1988. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* **1**: 679-691.

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

## Chapitre III :

**Several DNA regulatory elements for *Hoxa5* regional expression along the developing anteroposterior axis.**

Sébastien Tabariès, Marcelle Carter and Lucie Jeannotte.

Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada, G1R 2J6

Manuscrit en préparation pour soumission dans : *Journal of Biological Chemistry*



## PRÉSENTATION

Chez les vertébrés, le concept de prévalence postérieure a été émis pour expliquer le fait que lorsqu'une protéine, encodée par un gène exprimé plus postérieurement le long de l'axe AP, est exprimée ectopiquement dans des domaines plus antérieurs, ces domaines se trouvent transformés et présentent des caractéristiques plus postérieures. Cependant, quand des gènes normalement exprimés dans des régions antérieures sont exprimés dans des domaines plus postérieurs, aucune transformation d'antériorisation n'est observée au niveau du domaine d'expression ectopique (Duboule et Morata, 1994). Aucune démonstration expérimentale de cette prévalence postérieure n'a été rapportée.

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié une séquence de 164 pb incluse dans le MES et participant à la définition de la position de la frontière postérieure du domaine d'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* au niveau de pv10 (Tabariès et al., 2005). Dans le chapitre 3, nous présentons la poursuite de notre caractérisation du MES.

Pour ce faire, nous avons à nouveau utilisé une approche de transgénèse. Nous avons ainsi pu démontrer que la délétion des sites de liaison pour les protéines Cdx ne suffisait pas pour reproduire l'impact de la délétion complète du fragment AvEc-164 pb. Ceci suggère l'action d'autres facteurs pouvant lier le fragment AvEc-164 pb. Une analyse bioinformatique (TRANSFAC) a révélé la présence d'un site potentiel de liaison pour les protéines Hox.

Des études de retard sur gel réalisées avec des protéines Hox de souris produites *in vitro* ont permis de démontrer la liaison, sur la séquence Oligo1, de protéines Hox orthologues à la protéine AbdB de drosophile. Or ces protéines sont exprimées par des gènes exprimés dans des parties postérieures de l'embryon soulevant ainsi la possibilité d'un mécanisme de répression de l'expression d'un gène *Hox* antérieur par le produit des gènes *Hox* plus postérieurs, appuyant ainsi la notion de prévalence postérieure (Duboule et Morata, 1994).

Afin de déterminer quelle protéine Hox serait impliquée dans la régulation spatiale du gène *Hoxa5*, nous avons vérifié quelles protéines Hox étaient présentes dans des extraits

embryonnaires et si elles pouvaient lier de façon spécifique le fragment AvEc-164 pb. Nous avons ainsi identifié la protéine Hoxb9 comme candidate potentielle pouvant médier l'activité répressive du fragment AvEc-164 pb sur l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* dans les régions postérieures à pv10. Par ailleurs, cette étude s'avère être une première démonstration d'un mécanisme moléculaire appuyant le concept de prévalence postérieure.

Nous avons aussi mis en évidence l'existence d'une séquence d'ADN située à l'extrémité 3' du MES. Ce fragment de 331 pb, appelé PsHi-331 pb, est une séquence activatrice qui nécessite la liaison d'un facteur de transcription, qui reste encore à être défini, à un motif de 16 pb contenant une séquence pouvant être reconnue par un facteur à domaine homéo.

Dans le cadre de cette étude, Marcelle Carter a procédé à la microinjection des différentes constructions utilisées pour la transgénèse. Pour ma part, j'ai généré ces constructions et réalisé les études de retard sur gel. La rédaction du manuscrit a été réalisée conjointement avec le Dr Jeannotte.

## ABSTRACT

*Hox* gene functions are intimately linked to the correct developmental expression of the genes. In the laboratory, we are studying the *Hoxa5* gene, which plays a crucial role in axial patterning and in organogenesis. The MES, a mesodermal enhancer sequence located downstream of *Hoxa5* coding sequences, which targets transgene expression in mesodermal derivatives at the cervico-upper thoracic level, contains at least two regulatory sequences, identified as the AvEc-164 bp and the PsHi-331 bp fragments. The AvEc-164 bp sequence is necessary for the correct *Hoxa5* expression between prevertebra 3 and 10. In the present study, we demonstrate that Hox protein orthologs to the *Drosophila* AbdB protein specifically interact with the AvEc-164 bp sequence supporting the concept of posterior prevalence. The PsHi-331 bp DNA fragment participates in MES activity via the binding of a homeodomain-containing protein to a 16 bp motif. Our analysis clearly demonstrates that coordination between several *cis*-acting regulatory elements is needed to fully reproduce the correct spatial *Hoxa5* gene profile.

## INTRODUCTION

The *Hox* genes, an evolutionarily conserved gene family first described in *Drosophila*, are master regulators involved in specifying positional information along the anterior-posterior (AP) axis of diverse organisms (Lewis, 1978; Krumlauf, 1994). In vertebrates, these homeodomain-containing transcription factors are organized in four clusters, *HoxA* to *HoxD* (Krumlauf, 1994). The genomic organization of the *Hox* genes has been conserved throughout evolution and is fundamental for the precise spatio-temporal regulation and function of each gene (Garcia-Fernandez, 2005). It reflects the colinear relationship existing between the position occupied by each *Hox* gene on the chromosome, the expression domain along the embryonic axes, and the temporal onset: the *Hox* genes located at the 3' extremity of the clusters are expressed earlier and in more anterior regions of the embryo than the genes located at the 5' end of the clusters (Duboule and Morata, 1994; Kmita and Duboule, 2003). As a result, *Hox* gene expression domains are both spatially restricted and overlapping, extending from specific anterior boundaries down to the caudal end of the embryo. Axial patterning was proposed to be established by the combination of *Hox* genes expressed at a specific axial level, referred to the 'Hox code' (Kessel and Gruss, 1991). However, mutational analyses of *Hox* genes in mice have shown that their domains of action are mainly restricted to the anterior-most region of their expression domain (Stein et al., 1996; Aubin and Jeannotte, 2001), suggesting that at a given axial level, the information was mainly provided by the most posterior acting *Hox* gene, a phenomenon termed 'posterior prevalence' (Duboule, 1991; Bachiller et al., 1994; Duboule and Morata, 1994). In vertebrates, this concept was put forward to explain the lack of phenotype when *Hox* genes are ectopically expressed in regions anterior to their endogenous expression domain (Duboule and Morata, 1994). How posterior prevalence is achieved remains poorly understood. Possible explanations include that posterior *Hox* genes would determine posterior body patterns by repressing target genes activated by more anterior *Hox* genes or by binding more efficiently to shared sets of target genes (Lamka et al., 1992; Duboule and Morata, 1994; Capovilla and Botas, 1998).

A better comprehension of the controls governing *Hox* gene expression is needed to

decipher the mechanistic basis responsible for *Hox* gene function in axial patterning. Knowledge of the regulatory mechanisms involved in mammalian *Hox* gene expression mainly comes from transgenic mice studies. *Hox* gene regulation is thought to be achieved by a combination of strategies involving: (i) chromatin remodeling (Chambeyron and Bickmore, 2004); (ii) global enhancer sequences located outside the cluster and acting in a relatively promoter-unspecific manner (Kondo and Duboule, 1999; Kmita et al., 2002; Spitz et al., 2003); and (iii) integrated regulation of neighbouring genes through the sharing, the competition and/or the selective use of defined local *cis*-acting sequences (Gould et al., 1997; Sharpe et al., 1998; Kmita and Duboule, 2003). The endogenous expression pattern of some *Hox* genes can be recapitulated partly or entirely upon random integration in the genome of transgenes containing their DNA regulatory elements (Zákány et al., 1988; Tuggle et al., 1990; Behringer et al., 1993; Pöpperl et al., 1995; Bradshaw et al., 1996; Sharpe et al., 1998; Larochelle et al., 1999; Nowling et al., 1999; Oosterveen et al., 2003). The common emerging picture is that the expression pattern of individual *Hox* gene is generated by the positional information transduced by transcriptional factors interacting with a combination of both positive and negative *cis*-acting sequences to restrict the enhancer activities to a defined domain with specific expression boundaries (Studer et al., 1994; Gérard et al., 1996; Morrison et al., 1997). Among the upstream factors identified so far, the *caudal*-related family members have emerged as key regulators since Cdx proteins are able to convey positional information to *Hox* genes (Shashikant et al., 1995; Subramanian et al., 1995; Pownall et al., 1996; Chawengsaksophak et al., 1997; Epstein et al., 1997; Charité et al., 1998; Papenbrock et al., 1998; Lohnes, 2003; Deschamps and van Nes, 2005). *Hox* proteins themselves have also been reported as regulators of their own expression or that of other *Hox* genes (Maconochie et al., 1997; Gavalas et al., 1998; Gould et al., 1998; Studer et al., 1998; Manzanares et al., 2001).

To fully understand the regulatory events governing *Hox* gene expression, we are examining the *Hoxa5* gene. This gene provides a good model because of its central location in the *HoxA* cluster and its crucial role during embryogenesis as its loss-of-function mutation affects a well-defined subset of structures mainly located at the cervico-thoracic level (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998; Larochelle et al., 1999). In the developing embryo, *Hoxa5* is expressed in the neural tube caudal to the posterior

myelencephalon, in the axial skeleton up to the level of prevertebra (pv) 3 and in the mesenchymal component of several organs, including the trachea, the lung, the stomach, the intestine and the kidneys (Dony and Gruss, 1987; Gaunt et al., 1990; Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998; Aubin et al., 1999; Aubin et al., 2002a). Aside from morphological defects in foregut derivatives and mammary glands, (Aubin et al., 1997; Aubin et al., 2002a; Meunier et al., 2003; Garin et al., 2006), the targeted disruption of the *Hoxa5* gene perturbs axial skeleton identity in a region confined to the anterior-most region of the *Hoxa5* domain of expression along the prevertebral axis between pv3 and pv10 (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Four transcripts of 1.8, 5.0, 9.5 and 11 kb in length encompassing *Hoxa5* coding sequences originate from the use of different promoters and alternative splicing (Jeannotte et al., 1993; Y. Coulombe and L. Jeannotte, unpublished data).

The presence of complex and overlapping transcriptional units at the *Hoxa5* locus implies dispersed and shared regulatory regions in the cluster. Moreover, *Hox* gene function is intimately linked to its correct developmental regulation as illustrated by the homeotic transformations observed when *Hox cis*-acting regulatory elements are mutated (Gérard et al., 1996; Dupé et al., 1997; Zákány et al., 1997). This prompted us to characterize the regulatory elements directing *Hoxa5* developmental expression. Using a transgenic approach, we have demonstrated that an 11 kb genomic fragment, located between positions -3.8 kb and +7.3 kb, can recapitulate the temporal expression and substantially reproduce the spatial pattern of the *Hoxa5* 1.8 kb transcript (Larochelle et al., 1999). Deletion analyses have revealed several *cis*-acting DNA control elements, including a 604 bp brachial spinal cord enhancer (BSC) in 5' flanking sequences (Tuggle et al., 1990; Nowling et al., 1999), and a 2.08 kb mesodermal enhancer sequence (MES) downstream of *Hoxa5* coding sequences, the latter being essential for paraxial and lateral plate mesoderm expression in the cervical and upper thoracic region (Larochelle et al., 1999). This MES contains DNA elements that limit the *Hoxa5* regional specific expression domain along the AP axis, including a 164 bp DNA sequence (AvEc-164 bp) that binds Cdx proteins to correctly position the *Hoxa5* expression domain (Tabariès et al., 2005). Additional regulatory sequences involved in *Hoxa5* lung and gut expression have also been identified near the *Hoxa4* gene (Moreau and Jeannotte, 2002). In pursuing the characterization of the

MES sequence, we now present evidence that Hox co-regulation participates to caudally restrict *Hoxa5* expression by binding the AvEc-164 bp sequence. A 331 bp *PstI-HindIII* fragment possessing enhancer activity is also contributing to the MES activity for the establishment of the specific *Hoxa5* expression domain along the AP axis.

## MATERIALS AND METHODS

### Construction of *Hoxa5/lacZ* transgenes

All constructs have been derived from construct 9 (pLJ133) described in Larochelle et al. (1999). Briefly, pLJ133 contains the bacterial *lacZ* gene inserted into the *SacI* site of the first exon of the *Hoxa5* gene, allowing translation of the *lacZ* open reading frame from the *Hoxa5* AUG. This construct was digested with *HindIII* to remove a 2.08 kb fragment from +2.85 kb to +4.93 kb and self-ligated to produce an intermediate construct (pLJ143; not shown), containing a continuous *XhoI-HindIII* *Hoxa5* genomic fragment extending from –235 bp to +2.85 kb that does not direct  $\beta$ -galactosidase expression, as previously shown (Zákány et al., 1988). Construct 1 was obtained by deleting the Oligo1 sequence from pLJ133 via a PCR strategy using the synthetic oligonucleotide primers Sc162 and Sc163 (Table 3.1) containing the appropriate deletion (Wang and Malcolm, 1999). All introduced mutations were subsequently validated by sequencing. Insertion of the *PstI-HindIII* fragment referred to as PsHi-331 bp (from +4.60 kb to +4.93 kb) from construct 1 at the *HindIII* site (+2.85 kb) of pLJ143 resulted in construct 2. Construct 3 was derived from construct 8 in Tabariès et al. (2005) by deleting the PsHi-331 bp fragment. Addition of the *AccI-XhoI* fragment (from -1480 bp to -235 bp) at the *XhoI* site (-235 bp) of construct 3 resulted in construct 4. This construct contained the BSC element previously reported by Tuggle et al. (1990). Nucleotide substitutions in the identified Cdx binding sites used in Tabariès et al. (2005) were introduced into the 2.08 kb *HindIII* fragment extending from +2.85 kb to +4.93 kb. The plasmids containing the desired mutations were digested with *PstI* to remove the PsHi-331 bp DNA fragment and self-ligated. The resulting plasmid was digested with *HindIII*, and the fragment was subcloned into the *HindIII* site (+2.85 kb) of pLJ143 to obtain construct 5. Deletion of the last 104 bp (from +4.83 kb to +4.93 kb)



Table 3.1: Oligonucleotide sequences

Primer name	Primer sequence
Sc33	5'-CCTAGGAGGTACTCTGCTGT-3'
Sc35	5'-AGCGCTTTAACCCCTTCAA-3'
Sc124	5'-CCAAGTGCAGACAAATTCTCTC-3'
Sc125	5'-ATATGCGGCCGCAATCTCCTACTGACAAAGGGG-3'
Sc126	5'-ATATCTGCAGTCCTCTTCTCTTTTGTATTTGTT-3'
Sc127	5'-ATATGCGGCCGCAAGCTTGGCTTAAGCACATGG-3'
Sc138	5'-ATATAAGCTTATGTGTCAAGAAAAAC-3'
Sc139	5'-CACAAAGCTTCATAAAGGGTACTTTA-3'
Sc140	5'-ATATAAGCTTGGAAAACATAGATTATG-3'
Sc141	5'-CACAAAGCTTAAAACAGTCTCCAAGATT-3'
Sc162	5'-GTTCTCACCAGCCTGTGAGTCTTTAACTTTAGTCTTTGAATC-3'
Sc163	5'-GATTCAAAGACTAAAGTTAAAGACTCACAGGCTGGTGAGAAC-3'
Oligo-34 bp	5'-TCCTCTTCTCTTTTGTATTTGTTCTTTCTGTTT-3'
Oligo-33 bp	5'-GATCCCAGGAAATTTACATAATCTATGTTTTCC-3'
Oligo-33 bp (mut1)	5'- <u>ACCTGTGT</u> GAAATTTACATAATCTATGTTTTCC-3'
Oligo-33 bp (mut2)	5'-GATCCCAG <u>ATT</u> CGGGCCATAATCTATGTTTTCC-3'
Oligo-33 bp (mut3)	5'-GATCCCAGGAAATTTAAGCCGCTCATGTTTTCC-3'
Oligo-33 bp (mut4)	5'-GATCCCAGGAAATTTACATAATCTGCACCGGTA-3'
Oligo-16 bp	5'-GAAATTTACATAATCT-3'
SIF1	5'-GTGCAATAAACTTTATGAGTAA-3'

Nucleotide substitutions are underlined.

located in the 3' part of the PsHi-331 bp fragment or the 16 bp sequence (described in figure 3.6) from construct 2 resulted in constructs 6 and 7, respectively. All constructs described in the present study were made in pBluescript SKII+ (Stratagene) and purified following a cesium chloride centrifugation.

### **Production and genotyping of transgenic mice**

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the institutional animal care committee. The *Hoxa5/lacZ* sequences from all constructs were isolated using a *KpnI-NotI* digestion to remove vector sequences and they were purified on agarose gel. They were then injected into the pronuclei of fertilized eggs derived from (C57BL/6 x CBA) F1 hybrid intercrosses following standard procedures (Hogan et al., 1994). Transgenic founder embryos were recovered from foster mothers at day 12.5 of gestation (E12.5), genotyped by Southern analysis of yolk sac DNA using a *lacZ* specific probe to verify the integrity of the microinjected construct, and analyzed for *lacZ* expression by  $\beta$ -galactosidase staining as previously described (Laroche et al., 1999).

### **Electrophoretic mobility shift assays**

The expression vectors pSG5-*Cdx1*, pSG5-*Cdx2*, pSG5-*Cdx4*, pCMV-*Hoxb4*, pBluescript-*Hoxd4*, pSG5-*Hoxa5*, pET28a-*Hoxa7*, pET28b-*Hoxb8*, pET28b-*Hoxa9*, pET28b-*Hoxb9*, pSG5-*Hoxd9*, pSG5-*Hoxd10*, pET28a-*Hoxa11*, pSG5-*Hoxd11*, pET28a-*Hoxd12*, pSG5-*Pbx1a*, pSG5-*Pbx1b*, pET28b-*Meis1a*, pET28b-*Meis1b* and the TnT7 Quick coupled transcription/translation system (Promega Corporation) were used to produce *in vitro* each of the proteins that were then analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis and directly assayed for electrophoretic mobility shift assay (EMSA) as described previously (Tabariès et al., 2005). The AvEc-164 bp, AvEc-164 bp  $\Delta$ (HoxBS) and AvEc-164 bp  $\Delta$ (HoxBS+Oligo1) fragments were obtained by PCR reaction from plasmids carrying the MES sequence containing the appropriate deletion (pLJ122, pLJ409 and pLJ410, respectively) with the Sc33 and Sc35 primers (Table 3.1) end-labelled with T4 polynucleotide kinase and used in the EMSA reactions.

Various EMSA probes were obtained by PCR from pLJ122 using end-labelled primers (Table 3.1). They include (i) the PsHi-331 bp fragment with the primers Sc124 and Sc127, (ii) the 5' half of PsHi-331 bp fragment from nucleotides 1 to 160 using primers Sc124 and Sc125, (iii) the 3' half of PsHi-331 bp fragment from nucleotides 161 to 331 using primers Sc126 and Sc127, (iv) the first third (PsHiA-115 bp) of PsHi-331 bp from nucleotide 1 to 115 using primers Sc124 and Sc138, (v) the second third (PsHiB-112 bp) of PsHi-331 bp from nucleotides 116 to 227 using primers Sc139 and Sc140, (vi) the last third (PsHiC-104 bp) of PsHi-331 bp from nucleotides 228 to 331 using primers Sc141 and Sc127, (vii) the overlapping 67 bp sequence (from nucleotides 161 to 227) between the 3' half and the PsHiB-112 bp using primers Sc126 and Sc140. Double-stranded end-labelled oligonucleotides covering (i) the 5' half of the 67 bp (oligo-34 bp, Table 3.1) from nucleotides 161 to 194 and (ii) the 3' half of the 67 bp sequence (Oligo-33 bp, Table 3.1) from nucleotides 195 to 227 encompassing protein binding site were also tested. We focused on the Oligo-33 bp sequence that showed protein binding activity and EMSAs were performed with double-stranded end labelled oligonucleotides harbouring various mutations of the Oligo-33 bp, named Oligo-33 bp (mut1) to Oligo-33 bp (mut4), as well as Oligo-16 bp (Table 3.1). These EMSA probes were tested for protein binding using E9.5 whole cell extracts prepared as described in Charité et al., 1998. Binding reactions were done as previously described (Tabariès et al., 2005). The specificity of protein binding was assessed by addition of 100-fold excess of unlabeled probe prior to that of the radiolabeled probe. A 23 bp double-stranded DNA fragment of the sucrase-isomaltase promoter, SIF1 (Table 3.1), that contains two sequences interacting with the Cdx2 protein, was used as an unrelated competitor (Suh et al., 1994).

Supershift assays were done as previously described (Tabariès et al., 2005) using anti-Hoxa9 (Upsate), anti-Hoxb9 (Aviva), anti-Hoxd10 (Santa Cruz) or anti-Hoxd12 antibodies (Imgenex).

## RESULTS

### **Distinct MES regulatory sequences mediate *Hoxa5/lacZ* regional expression**

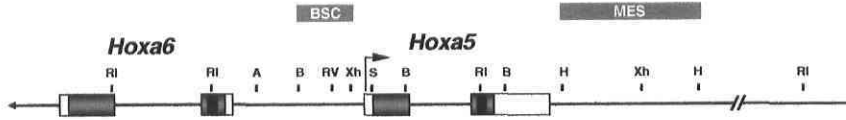
The MES enhancer region was shown to target transgene expression in the prevertebral column between pv3 and pv10, with a stronger signal in the pv3-pv6 region (Larochelle et al., 1999; Tabariès et al., 2005). Pursuing the characterization of this enhancer sequence, we have reported a 164 bp fragment, named AvEc-164 bp, acting as a repressor in the caudal part of the embryo to define the posterior boundary of transgene expression at the level of pv10. Cdx proteins were shown to interact specifically with two Cdx binding sites enclosed in a 25 bp sequence, named Oligo1, and this binding was shown to be involved in the repressive effect of the AvEc-164 bp fragment (Tabariès et al., 2005).

To gain further insight into the MES, deletions were made to delineate the DNA elements enclosed and they were tested in E12.5 F0 transgenic embryos. Deleting the Oligo1 sequence (construct 1; Figs 3.1B, 3.2A) resulted in a pattern similar to that observed when the two Cdx binding sites were mutated with a loss of the posterior boundary at the level of pv10. However, the effect was less important than the one observed with the complete deletion of the 164 bp fragment in which the expression domain extended to the caudal part of the embryo (referred to construct 8 in Tabariès et al., 2005). This result suggested that other DNA elements from the AvEc-164 bp fragment may be involved in the posterior restriction of the *Hoxa5* expression domain.

### ***Hox* gene products bind *in vitro* to the *AvrII-Eco47III* 164 bp fragment**

To identify the other critical sequences from the AvEc-164 bp sequence involved in axial regional specification, we searched for binding sites of known *trans*-acting factors that could transduce positional information to *Hox* genes. By sequence comparison with TFsearch database (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>), we found one potential site with a high homology to the consensus binding site for the AbdB homeotic gene product (Fig. 3.3B). To establish whether Hox proteins can bind the AvEc-164 bp fragment, we performed EMSA with murine Hox proteins from different paralogous groups produced *in vitro* (Fig. 3.3C). Among these proteins, Hoxa9, Hoxb9, Hoxd9, Hoxd10, Hoxd11 and Hoxd12, orthologs to the *Drosophila* AbdB protein formed binding complexes with the AvEc-164 bp fragment (Fig. 3.3C, lanes 9, 11, 13, 15, 19, and 21).

**A**

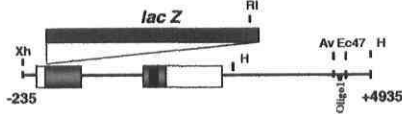


**B**

#

1

pLJ 367-5.14



*lac Z* positive/  
No. of TG

7/9

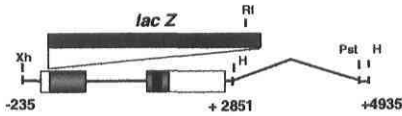
Expression

pv. post.  
bound.

6 3

2

pLJ 151-3.45

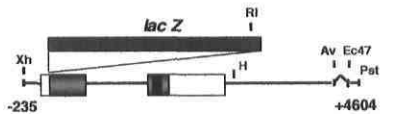


8/12

6 4

3

pLJ 157-4.68

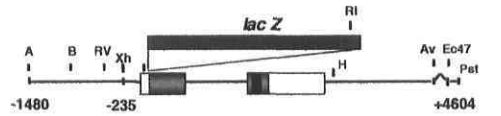


2/9

2 1

4

pLJ 420-5.93

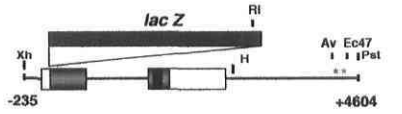


3/4

3 1

5

pLJ 248-4.84 (mut1,2)

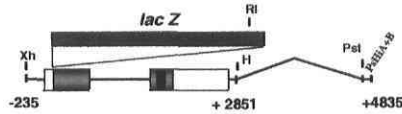


10/20

9 0

6

pLJ 359-3.36

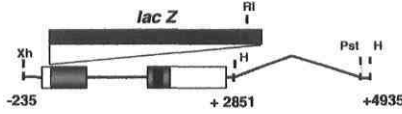


3/4

3 1

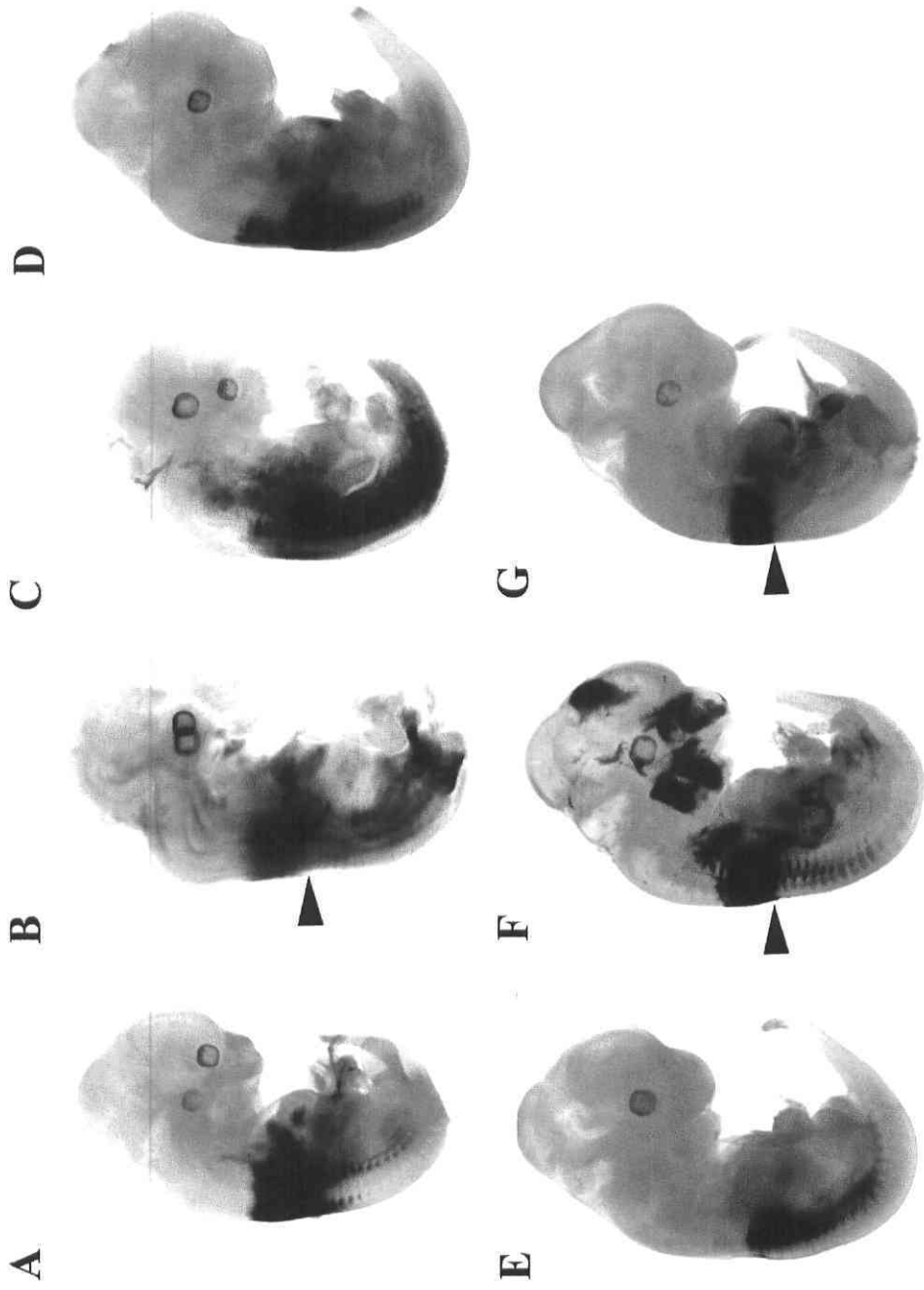
7

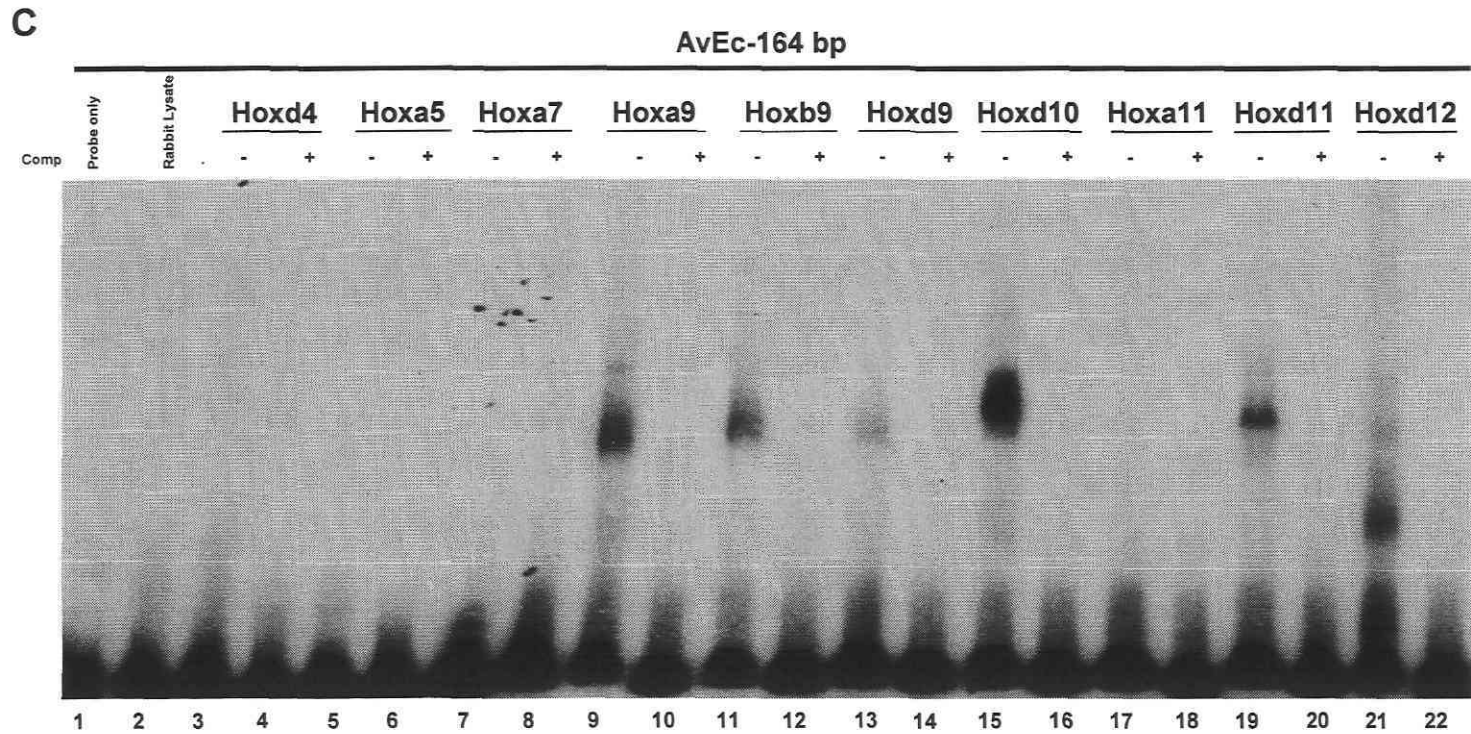
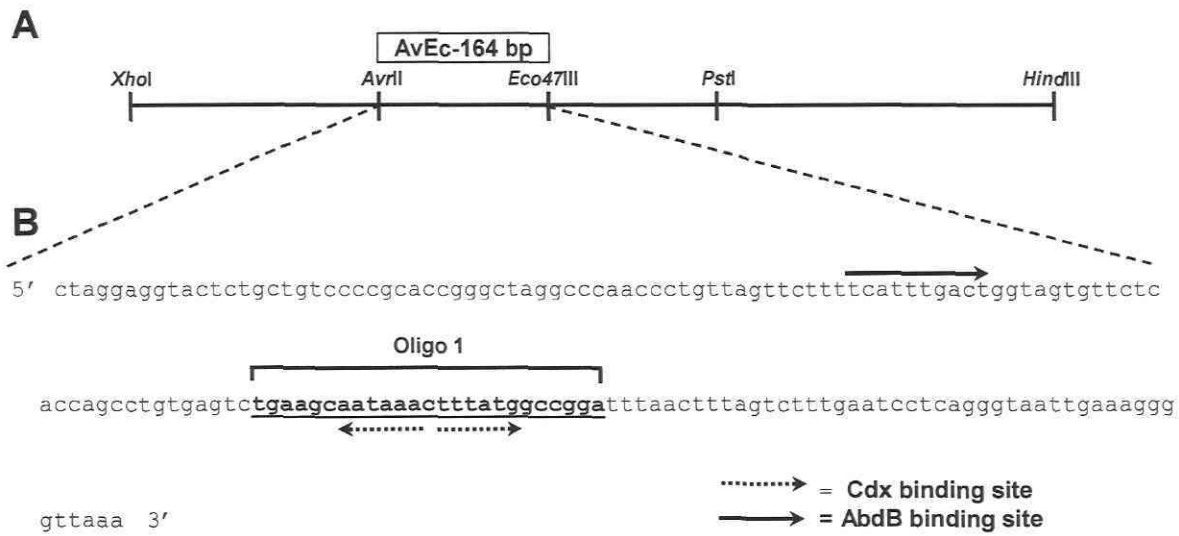
pLJ 408-3.43



1/5

1 1



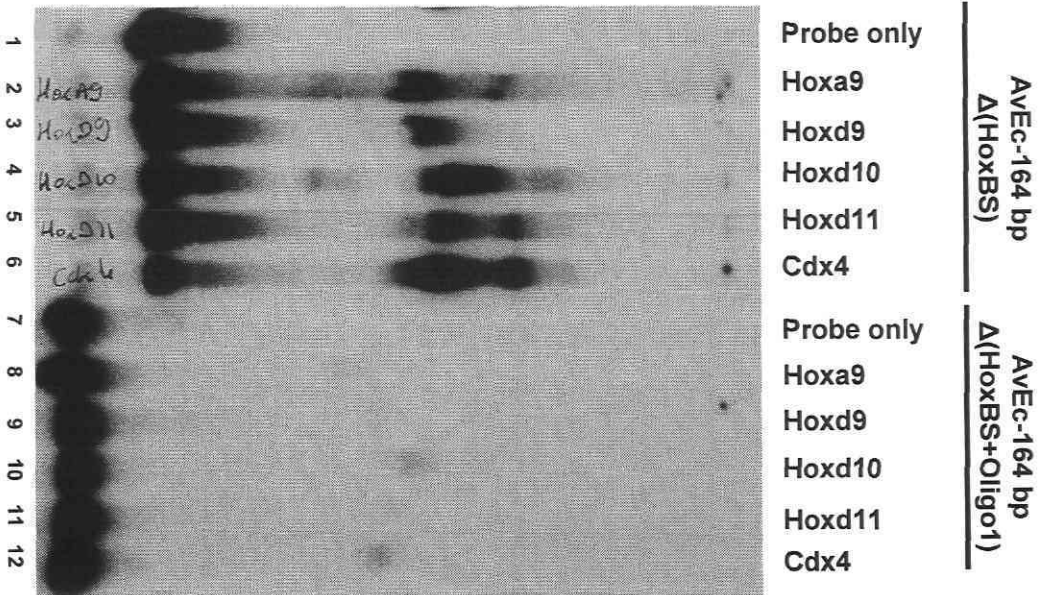




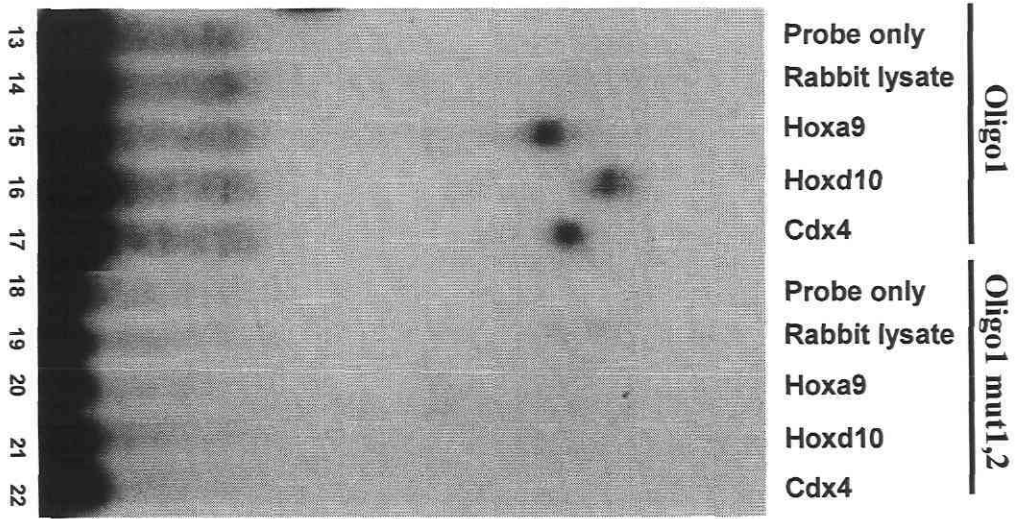
Specificity of binding was confirmed by competition studies with a 100-fold excess of unlabeled probe that resulted in a reduction of protein binding (Fig. 3.3C, lanes 10, 12, 14, 16, 20 and 22). No binding was observed with Hoxd4, Hoxa5, Hoxa7 and Hoxa11 indicating the specificity of binding to defined AbdB-like murine Hox proteins (Fig. 3.3C, lanes 3, 5, 7 and 17). To delineate the DNA element that bind these Hox proteins, EMSAs were performed with versions of the AvEc-164 bp fragment carrying mutations of the AbdB binding site (AvEc-164 bp $\Delta$ (HoxBS)) or of both the AbdB binding site and the Oligo1 sequence (AvEc-164 bp $\Delta$ (HoxBS+Oligo1)). These experiments revealed that the binding did not occur at the Hox binding site found by TRANSFAC analysis but occurred within the Oligo1 sequence. This was confirmed by EMSA with the Oligo1 sequence carrying wild-type or mutated Cdx binding sites, which demonstrated that Hox proteins bound specifically to the Oligo1 sequence via the Cdx binding sites (Fig 3.4A, B, lanes 3-6, 8-12 and 15-17). While nucleotide substitutions in site 1 (mut1) or in site 2 (mut2) did not alter the binding of the Hox proteins to Oligo1 (not shown), their combined mutations in Oligo1 (Oligo1 mut1,2) abolished the formation of specific binding complexes (Fig. 3.4B, lanes 20-22; Tabariès et al., 2005). Thus, proteins from AbdB-like more posterior groups could affect *Hoxa5* gene expression domain, a result in agreement with the concept of posterior prevalence. Indeed, the AvEc-164 bp fragment acted as a repressor of the *Hoxa5* gene expression posteriorly to pv10. Moreover, only Hox proteins expressed posteriorly to pv10 were able to bind specifically the AvEc-164 bp sequence suggesting that this binding resulted in the repression of the *Hoxa5* gene in the domains of the posteriorly expressed *Hox* genes.

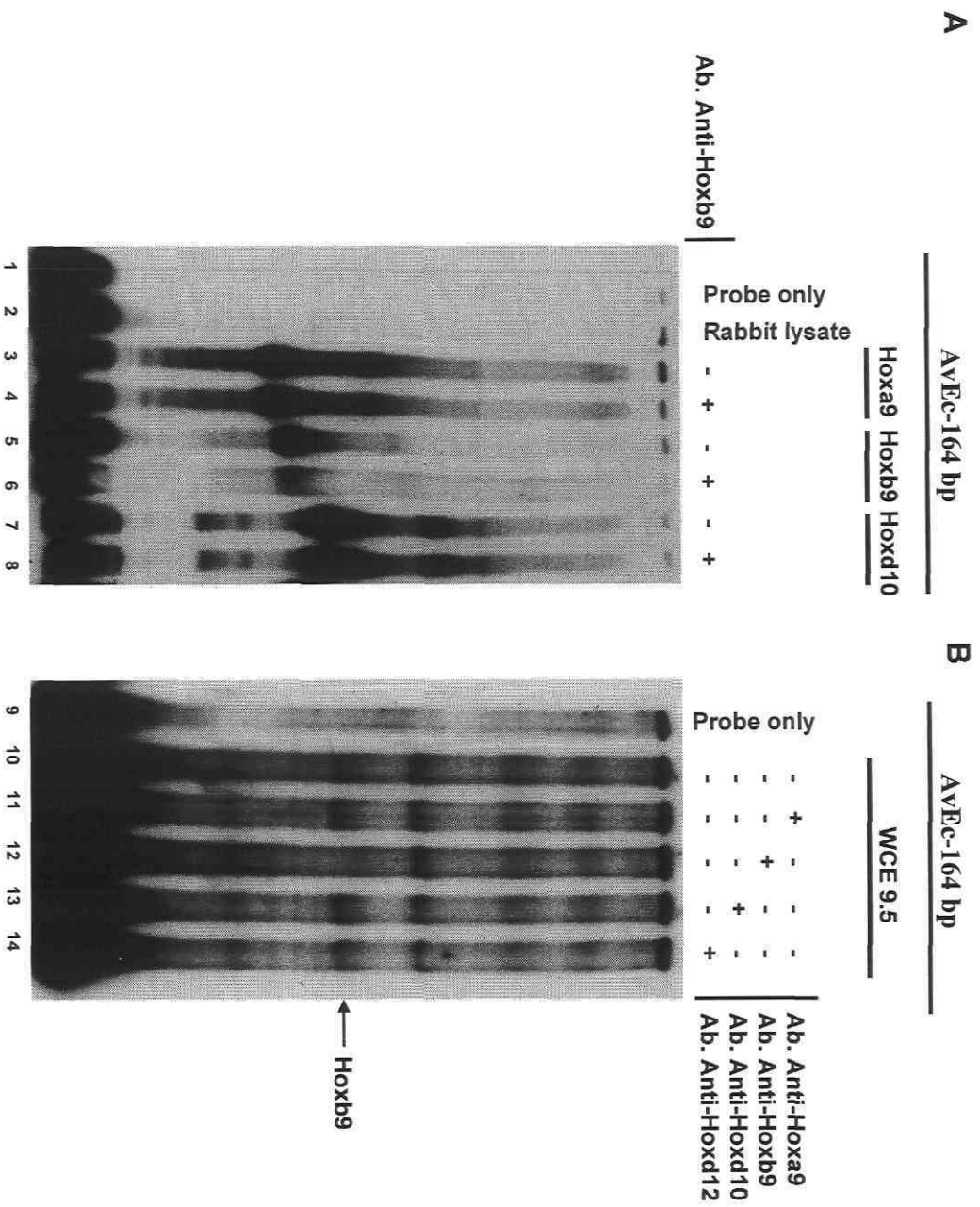
To establish the functional significance of the Hox protein binding, we performed supershift assays using E9.5 embryo protein extracts and the AvEc-164 bp as probe (Fig. 3.5). Several proteins present in the extract were able to bind the AvEc-164 bp fragment (Fig 3.5, lane 10). To test if the E9.5 embryo protein complexes that bound the AvEc-164 bp sequence contained Hox proteins, supershift EMSAs were performed using E9.5 embryo protein extracts, AvEc-164 bp and Hox specific antibodies (Fig. 3.5, lanes 11-14). The specificity of each antibody was assessed by EMSA with the different Hox proteins produced *in vitro*, as shown for the anti-Hoxb9 antibody (Fig. 3.5, lanes 4, 6 and 8; data not shown). While addition of the anti-Hoxa9, anti-Hoxd10 or anti-Hoxd12 antibodies to the

**A**



**B**





embryo protein extract-AvEc-164 bp reaction did not modify the pattern of bands (Fig. 3.5, lanes 11, 13 and 14), addition of the anti-Hoxb9 antibody to the embryo protein extract-Oligo1 reaction led to a near-complete loss of the AvEc-164 bp-Hoxb9 complex (Fig. 3.5, lane 12). Taken together, these results demonstrated that the Hoxb9 protein is present in E9.5 embryo protein extract and can bind specifically to the Oligo1 sequence. Thus, Hoxb9 appears as a potential regulator for the correct positioning of the posterior boundary of *Hoxa5* expression in the upper thoracic region along the axial skeleton.

### **The PsHi-331 bp fragment participates to the MES enhancer activity**

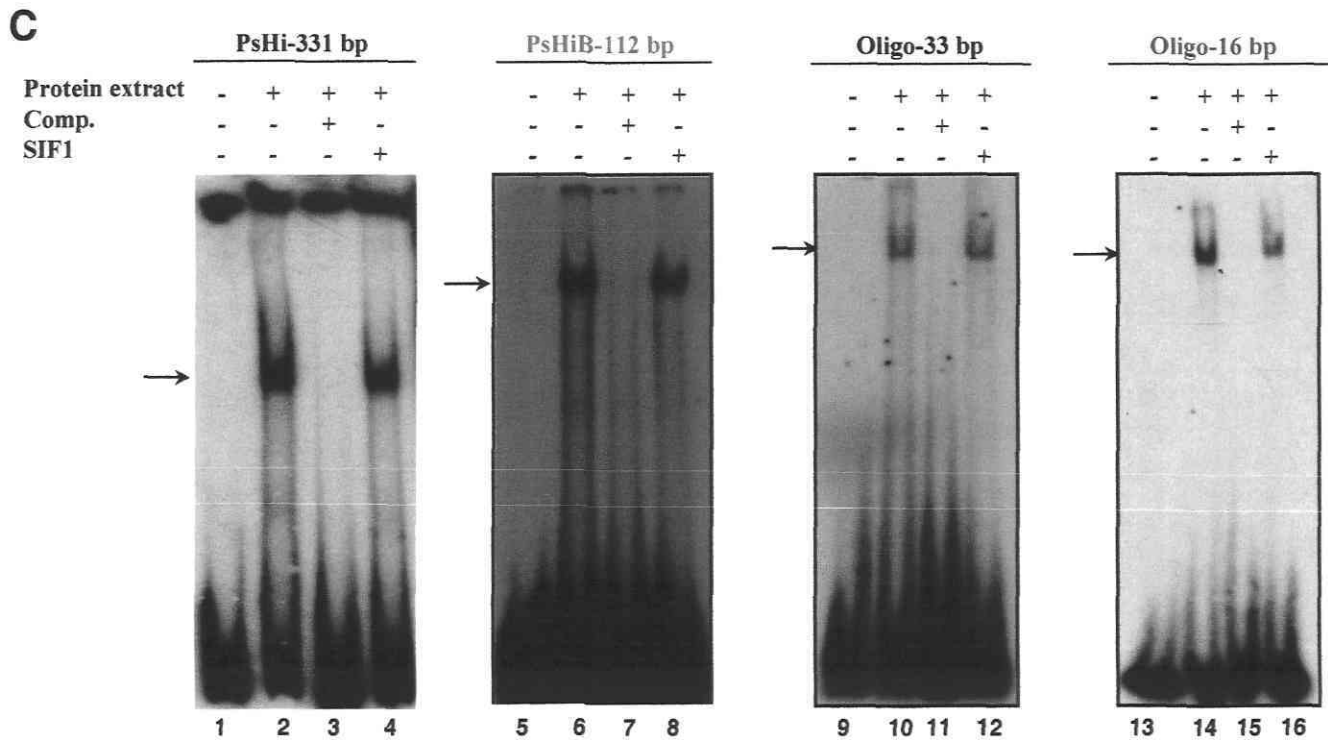
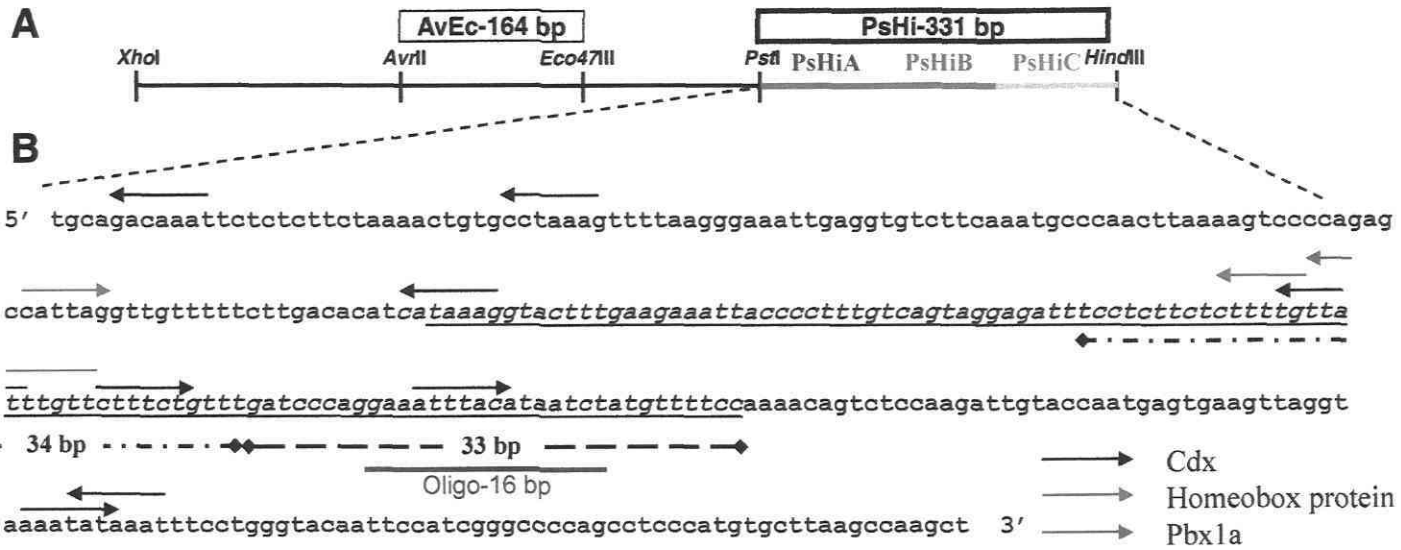
We have previously shown that the removal of the PsHi-331 bp located at the 3' end of the MES caused a loss of expression in the mesenchymal condensations of the developing limb buds (Tabariès et al., 2005). To further define the contribution of the PsHi-331 bp fragment to the MES activity, a construct carrying this DNA sequence in 3' of a *Hoxa5/lacZ* minimal construct was designed (construct 2; Fig. 3.1B). This *Hoxa5/lacZ* minimal vector included 3.09 kb of *Hoxa5* genomic sequences from -235 bp to +2.85 kb that on its own cannot direct transgene expression (Zákány et al., 1988). Construct 2 drove  $\beta$ -galactosidase expression in the cervical region of the prevertebral column with a well-established posterior limit in the upper thoracic region at the level of pv10 (Fig. 3.2B). This result suggested that the PsHi-331 bp possessed enhancer properties since this sequence was able to direct region-specific expression on its own in the context of the proximal *Hoxa5* promoter and thus may contribute to the MES enhancer activity.

To determine if the AvEc-164 bp and the PsHi-331 bp fragments work together to drive the region-specific expression of *Hoxa5*, both elements were deleted. This resulted in a loss of X-gal staining along the AP axis similar to what was observed for the deletion of the AvEc-164 bp (construct 3, Figs. 3.1B, 3.2C; Tabariès et al., 2005). When a *AccI-XhoI* fragment containing the BSC regulatory element was added, expression was detected in the brachial spinal chord as expected and the staining in the prevertebral column was comparable to the staining obtained with the deletion of the AvEc-164 bp (construct 4, Figs 3.1B; 3.2D; Tabariès et al., 2005). The presence of a posterior boundary in some stained embryos can be explained by the fact that these embryos were weak expressors. Taken together, these results did not support a clear synergistic action between the two DNA

fragments to specify the posterior boundary of the *Hoxa5/lacZ* transgene at the level of pv10. In the same way, the PsHi-331 bp deletion coupled with the nucleotide substitution in the Cdx binding sites presents in the Oligo1 sequence (construct 5; Figs 3.1B; 3.2E) resulted in a loss of the posterior restriction, which was similar to that observed with the Cdx mutations only (construct 12 in Tabariès et al., 2005) reinforcing the notion that although the PsHi-331 bp fragment participated in the MES enhancer activity, there was no cooperation with the AvEc-164 bp to define the posterior boundary of the *Hoxa5* expression domain at the level of pv10.

### **Embryonic proteins bind to the PsHi-331 bp fragment**

To define the sequences responsible for the enhancer activity of the PsHi-331 bp fragment, we first investigated whether the PsHi-331 bp fragment contains binding sites for known *trans*-acting factors. By sequence comparison with TFsearch database or Transcription Element Search System (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>), we found binding sites for several putative *Hox* transcriptional regulators, including Cdx, Pbx and other homeodomain-containing proteins (Fig. 3.6B). To establish whether proteins can bind to the PsHi-331 bp fragment, Cdx, Pbx1a, Pbx1b, Meis1a and Meis1b proteins were produced *in vitro* and EMSAs were performed. However, no binding was observed (data not shown). We repeated EMSA experiments with the PsHi-331 bp fragment using E9.5 embryo protein extracts (Fig. 3.6C). Binding complexes were detected (Fig. 3.6C, lane 2) and further characterization of the specific interactions of proteins with each half and each third of the PsHi-331 bp fragment revealed that embryonic proteins bound specifically to the 3' half (not shown) and the second third of the fragment named PsHiB-112 bp (Fig. 3.6C, lane 6). Depending on the protein extract used, binding was sometimes detected on the first third named PsHiA-115 bp (data not shown). No binding was observed on the last third of the PsHi-331 bp sequence. Moreover, removal of this latter sequence from construct 2 had no effect on the enhancer activity carried by the PsHi-331 bp fragment in E12.5 F0 *Hoxa5/lacZ* transgenic embryos and on its ability to drive *lacZ* expression in the pv3-pv10 region (construct 6; Figs 3.1B, 3.2F). No stained transgenic embryo was obtained with vectors carrying either the PsHiA-115 bp or the PsHiB-112 bp (data not shown). Taken together, these results suggested that the activity of the PsHi-331 bp fragment is





carried by the first two thirds of the PsHi-331 bp and that proteins can bind to a 67 bp overlapping sequence between the 3' half of PsHi-331 bp and PsHiB-112 bp.

To delineate the binding sequence in the 67 bp fragment, synthetic oligonucleotides corresponding to each half of the 67 bp fragment were used in EMSAs experiments and revealed that proteins bound specifically to the distal half named Oligo-33 bp (Fig. 3.6B-C, lane 10). Synthetic oligonucleotides containing successive mutations of the Oligo-33 bp, named Oligo-33 bp (mut 1), Oligo-33 bp (mut2), Oligo-33 bp (mut3) and Oligo-33 bp (mut 4) (Table 3.1), were tested in EMSAs. The loss of binding with Oligo-33 bp (mut2) and Oligo-33 bp (mut 3) led us to identify a 16 bp double-stranded oligonucleotide, named Oligo-16 bp that spans one putative Cdx consensus binding site, as the only target for protein binding (Fig. 3.6C, lane 14). Footprint analysis confirmed that protein binding occurred to the Oligo-16 bp sequence (data not shown). Specificity of binding was confirmed by competition studies with a 100-fold excess of unlabeled probe that resulted in a substantial reduction of protein binding (Fig. 3.6C, lanes 3, 7, 11 and 15). Moreover, addition of a 100-fold excess of an unrelated SIF1 primer did not compete (Fig. 3.6C, lanes 4, 8, 12 and 16). Taken together, these observations suggested that despite the presence of a putative binding site for Cdx proteins, they were not involved in the binding to the Oligo-16 bp sequence since SIF1 can not efficiently compete for the binding. Other homeodomain-containing proteins may therefore be implicated in the binding to the oligo-16 bp sequence. This was directly tested by EMSAs using Oligo-33 bp and Hoxa5, Hoxd9, Hoxd10, Hoxd11 proteins, as well as Cdx, Pbx1a and Pbx1b proteins produced *in vitro*. However, no binding was observed with all these proteins (data not shown).

To further establish the functional significance of the Oligo-16 bp motif, E12.5 F0 *Hoxa5/lacZ* transgenic embryos were produced to assess the effect on transgene expression of the deletion of the 16 bp sequence. Deletion of the Oligo-16 bp in construct 2 generated construct 7 (Fig. 3.1B), and 1 stained embryo out of the 5 transgenic embryos obtained presented an expression pattern similar to that observed with construct 2 (Figs. 3.1C, 3.2G). Altogether, these results indicated that although E9.5 embryonic proteins could bind to a 16 bp motif enclosed in the PsHi-331 bp fragment, this motif did not seem essential for the enhancer activity of the PsHi-331 bp fragment. The identity of the binding factor remains to



be described.

## DISCUSSION

To better define the mechanisms regulating *Hoxa5* gene expression and involved in the correct development of structures from the cervical and upper thoracic axial level, we have pursued our analysis of the MES region. Coordination between several *cis*-acting regulatory elements is needed to fully reproduce the correct spatial and temporal *Hoxa5* gene profile (Tuggle et al., 1990; Larochelle et al., 1999; Nowling et al., 1999; Moreau and Jeannotte, 2002; Tabariès et al., 2005). In addition to the MES, regulatory sequences include the BSC sequence, which specifically drives *Hoxa5* gene expression in the brachial region of the spinal cord from E11.0 to E13.0, and the lung/gut sequence located in the *Hoxa4-Hoxa5* intergenic region.

### ***Hoxb9* gene product binds to the AvEc-164 bp element**

Definition of expression domain boundaries is necessary for proper *Hox* gene action. The functional limits of *Hoxa5*, as delineated by the axial skeletal phenotype observed in *Hoxa5* mutant mice, are restricted to the pv3-pv10 region (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Posterior restriction at the pv10 level is further delimited by the AvEc-164 bp fragment, enclosed within the MES, that acts as a repressor in the caudal part of the embryo (Tabariès et al., 2005). The pv3-pv10 region corresponds to the specific expression domain of the 1.8 kb transcript, which is the sole *Hoxa5* transcript expressed in the structures affected by the mutation at this axial level, such as the respiratory tract, the thyroid gland and the pectoral girdle (Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998; Larochelle et al., 1999; Aubin et al., 2002b; Meunier et al., 2003). As the 1.8 kb transcript is likely to encode the functional form of the *Hoxa5* gene, its expression domain must be tightly regulated. The transgenic vectors used in our approach allow the regulation of the proximal promoter, which is a useful tool to investigate the regulatory mechanisms governing *Hoxa5* regional expression in its functional domain.

We have previously identified two functional Cdx binding sites in the AvEc-164 bp fragment involved in the positioning of the posterior boundary of *Hoxa5* gene expression domain (Tabariès et al., 2005). Moreover, we have shown that Cdx4 specifically interacts with these sites. Among the murine *Cdx* genes, *Cdx4* is the most posteriorly expressed and its expression ceases at E10.5 (Gamer and Wright, 1993). Therefore, the X-gal staining pattern reported in E12.5 F0 transgenic embryos is likely due to an earlier regulatory event that may be directed by Cdx4. Indeed, *in vivo* detection of Cdx4 protein binding occurred with E9.5 embryo extract but not with extracts from older specimens suggesting an involvement of Cdx4 in the establishment of the correct *Hoxa5* posterior boundary at the upper thoracic level. Recently, the targeted inactivation of the murine *Cdx4* gene did not reveal homeotic transformation in mutants (van Nes et al., 2006). This result was unanticipated based on our hypothesis that *Cdx4* acts to restrict the *Hoxa5* gene expression domain. Indeed, an extension of the *Hoxa5* expression domain should have resulted from the *Cdx4* inactivation and caused homeotic transformations in the domain where *Hoxa5* would have been ectopically expressed. However, we can not exclude the possibility that posterior *Hox* genes prevail over ectopically-expressed *Hoxa5* gene as stated by the concept of posterior prevalence. Furthermore, no effect on the *Hoxa5* expression pattern was observed in E8.5 *Cdx4* mutants (J. Deschamps and L. Jeannotte, unpublished data). These new data suggest that *Cdx4* may not play a preponderant role in *Hoxa5* posterior restriction. Though Cdx4 remains a putative regulator involved in *Hoxa5* expression along the AP axis, the possibility exists that other homeobox-containing factors may also participate to this process.

In the present study, we demonstrated that Hox proteins produced *in vitro* can bind the AvEc-164 bp repressive sequence restricting *Hoxa5* gene expression caudally to pv10. Interestingly, only proteins encoded by murine orthologs to the *Drosophila AbdB* gene can do so (Fig. 3.3C). Among these, Hoxb9 emerges as the potential *in vivo trans*-acting factor in *Hoxa5* regulation as it was present in embryo protein extracts. Interestingly, Hoxb9 protein recognizes the same two sites enclosed in the Oligo1 sequence as Cdx proteins. From these results, it could be hypothesized that Cdx and Hox proteins cooperate or compete for the binding to this sequence. Although, we have clearly demonstrated the importance of the two Cdx binding sites from the Oligo1 sequence, the impact of the

complete deletion of the AvEc-164 bp is more important than the one seen when the Oligo1 sequence is absent, suggesting that other factors could act on the AvEc-164 bp sequence (Figs 3.1B, 3.2A; Tabariès et al., 2005). In fact, other proteins specifically bind the AvEc-164 bp fragment (Fig. 3.5, lane 6) suggesting the possible cooperation between several factors for the establishment of the correct *Hoxa5* posterior boundary at the upper thoracic level.

### **The posterior prevalence concept**

It was proposed that axial patterning relies upon a given partition of *Hox* functional domains along the developing AP axis (Kmita and Duboule, 2003). The concept of posterior prevalence states that posteriorly expressed *Hox* genes functionally prevail over more anterior genes (Duboule and Morata, 1994). This mechanism was put forward to explain the fact that ectopic expression of *Hox* genes generally results in homeotic transformations confined to region anterior to the normal expression domain of the ectopically expressed gene (Gonzalez-Reyes and Morata, 1990; Mann and Hogness, 1990). However, little is known concerning the way this posterior prevalence is achieved. Several strategies may be envisaged to explain the suppressive mechanism by which a posterior *Hox* gene imposes its functional dominance (Kmita and Duboule, 2003). For instance, it has been hypothesized that the posterior prevalence reflects a gradation in the binding activity of the *Hox* gene products, the posterior-expressed genes presenting a better efficiency to bind to commune sets of target genes (LaRonde-LeBlanc and Wolberger, 2003). On the other hand, a competition could occur for the binding to shared co-factors (Zhao and Potter, 2002).

The *Hoxb9* binding to regulatory sequences of the *Hoxa5* gene is in agreement with the posterior prevalence concept. In fact, the *Hoxb9* gene possesses an anterior boundary of expression at the pv10 level (Chen and Capecchi, 1997). It could be hypothesized that *Hoxb9* binds the AvEc-164 bp sequence to prevent the expression of the major *Hoxa5* transcript caudally to pv10 in the *Hoxb9* expression domain. The study of the *Hoxa5* gene expression in *Hoxb9* mutant mice will be of interest to confirm the impact of *Hoxb9* binding to restrict the *Hoxa5* gene expression domain. Nevertheless, because of the difficulty to obtain specific *Hox* antibodies working in supershift experiments, it remains to

test if other caudally expressed Hox proteins act on the Oligo1 sequence to restrict the *Hoxa5* expression domain to the pv3-pv10 region. Among the Hox proteins expressed posteriorly to pv10 and not tested in this study, only *Hoxb7* has an anterior boundary in the vicinity of pv11 (Izpisúa-Belmonte et al., 1991; Burke et al., 1995). Taken together, these results are a first evidence for a direct interaction of a posterior Hox protein with a repressive regulatory element to prevent an anteriorly-expressed *Hox* gene to be expressed caudally of its functional domain. How the binding of *Hoxb9* protein represses the *Hoxa5* gene caudally to pv10 remains unknown. However, it could be hypothesized that the *Hoxb9* binding acts at the transcriptional level preventing the *Hoxa5* gene transcription in the *Hoxb9* expression domain. On the other hand, post-transcriptional events whereby a *Hox* transcript is selectively destabilized in posterior domain may be used to confine *Hox* gene expression as demonstrated for the *Hoxb4* gene (Brend et al., 2003). These strategies may co-exist.

#### **A homeodomain-containing protein binds to the PsHi-331 bp element**

We have previously shown that the MES directs expression in the skeleton at the cervical and upper thoracic axial level and that the MES sequence encloses DNA elements in its 3' half able to target transgene expression in the limb buds and in the urogenital and intestinal tracts (Tabariès et al., 2005). We have now mapped a regulatory element, the PsHi-331 bp fragment that likely participates in MES enhancer activity in the pv3-pv10 region. In contrast to the AvEc-164 bp fragment, the PsHi-331 bp fragment possesses enhancer properties (Figs. 3.1B, 3.2B). Proteins from embryo protein extracts can physically interact with the PsHi-331 bp regulatory sequence via a 16 bp motif containing a homeodomain protein binding site. According to our assays, Cdx and Hox proteins do not bind the sequence and additional work will be needed to identify the homeodomain-containing factor involved. Furthermore, depending on the protein extracts used in EMSA experiments, binding was sometimes observed on the PsHiA-115 bp fragment (not shown) suggesting that other factors to be identified could be implicated in the enhancer activity carried by the PsHi-331 bp. Our analysis clearly demonstrates that coordination between several *cis*-acting regulatory elements is needed to fully reproduce the correct spatial *Hoxa5* gene profile.

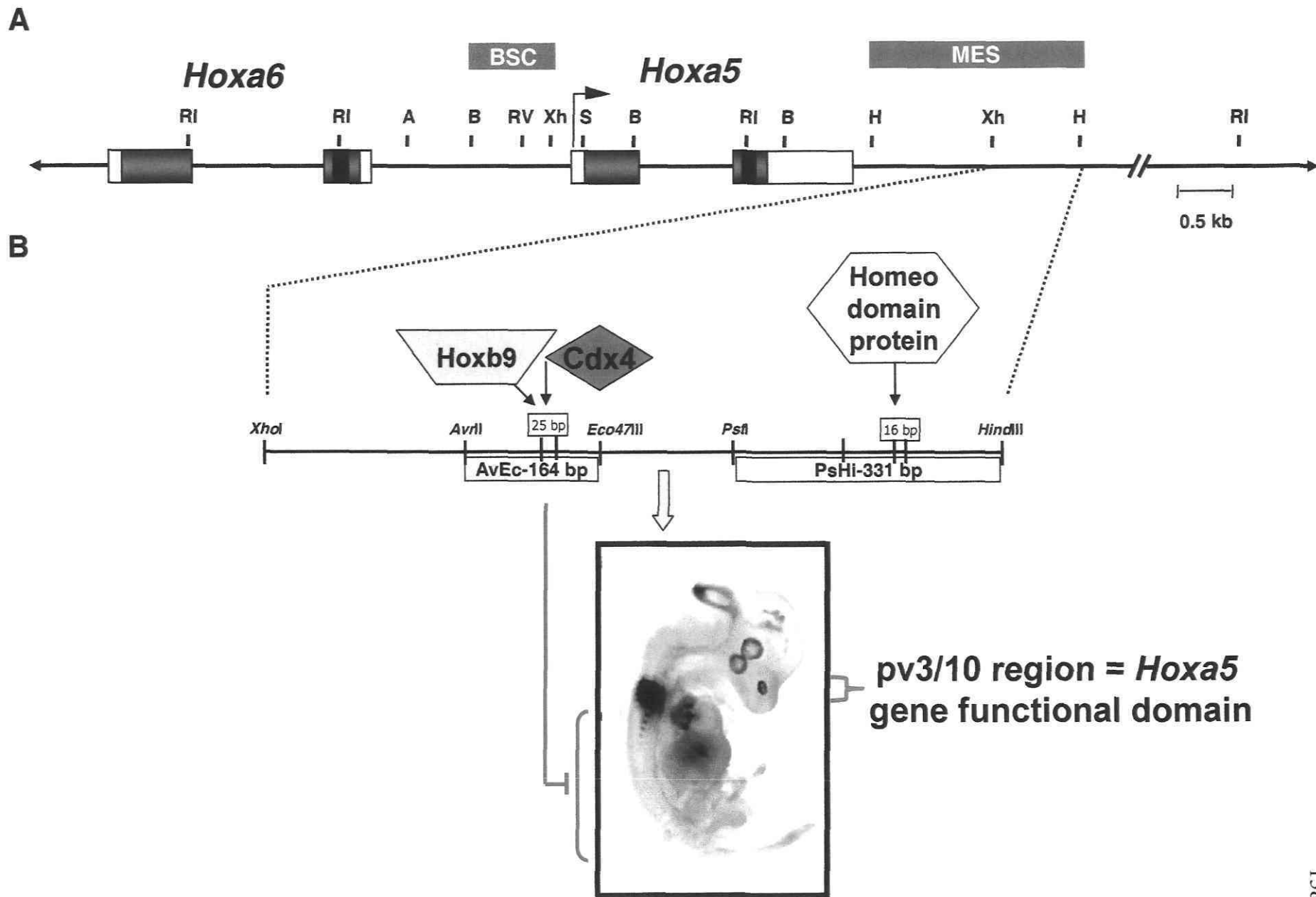
### **Homeodomain proteins act to restrict the *Hoxa5* gene expression**

From our results, it is possible to establish a putative model for the restriction of *Hoxa5* expression in axial skeleton (Fig. 3.7). Thus, the 892 bp *XhoI-HindIII* located in the 3' half of the MES encompasses at least two *cis*-acting regulatory elements involved in specific regional control activities. Several *trans*-acting factors are implicated in these activities. For instance, Cdx4 and Hoxb9 proteins bind to the Oligo1 sequence enclosed in the AvEc-164 bp while a homeodomain-containing protein, that remains to be identified, binds to the PsHi-331 bp element. The AvEc-164 pb fragment acts to repress the expression of the *Hoxa5* 1.8 kb major transcript caudally to pv10 and to restrict the expression domain to the functional *Hoxa5* domain between pv3 and pv10, while the PsHi-331 bp directs expression in the pv3-pv10 region.

In summary, our work gives insights into the complex mechanisms by which *trans*-acting factors participate in the posterior delimitation of the *Hoxa5* functional domain. Furthermore, our data favour the concept of posterior prevalence as a strategy to define *Hox* gene functional domain at the cervical-upper thoracic axial level.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Drs. J. Aubin and J. Charron for helpful comments on the manuscript, and F.-A. Bérubé-Simard for technical help. We are also grateful to Drs. J. Deschamps, M. Featherstone and C. Largman for providing Cdx, Pbx, Meis and Hox expressing vectors. This work was supported by a CIHR grant (MOP-68999). L. J. holds a Chercheur National Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.



## REFERENCES

- Aubin J, Chailier P, Ménard D, Jeannotte L. 1999. Loss of *Hoxa5* gene function in mice perturbs intestinal maturation. *Am J Physiol.* 277:C965-973.
- Aubin J, Déry U, Lemieux M, Chailier P, Jeannotte L. 2002a. Stomach regional specification requires *Hoxa5*-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development.* 129:4075-4087.
- Aubin J, Jeannotte L. 2001. Implication des gènes Hox dans les processus d'organogénèse chez les mammifères. *Médecine/Sciences* 17:54-62.
- Aubin J, Lemieux M, Moreau J, Lapointe J, Jeannotte L. 2002b. Cooperation of *Hoxa5* and *Pax1* genes during formation of the pectoral girdle. *Dev Biol.* 244:96-113.
- Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Behringer RR, Jeannotte L. 1998. Transcriptional interferences at the *Hoxa4/Hoxa5* locus: importance of correct *Hoxa5* expression for the proper specification of the axial skeleton. *Dev Dyn.* 212:141-156.
- Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Bérard J, Jeannotte L. 1997. Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol.* 192:432-445.
- Bachiller D, Macias A, Duboule D, Morata G. 1994. Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. *EMBO J* 13:1930-1941.
- Behringer RR, Crotty DA, Tennyson VM, Brinster RL, Palmiter RD, Wolgemuth DJ. 1993. Sequences 5' of the homeobox of the *Hox-1.4* gene direct tissue-specific expression of *lacZ* during mouse development. *Development* 117:823-833.
- Bradshaw MS, Shashikant CS, Belting HG, Bollekens JA, Ruddle FH. 1996. A long-range regulatory element of *Hoxc8* identified by using the pClasper vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2426-2430.



- Brend T, Gilthorpe J, Summerbell D, Rigby PW. 2003. Multiple levels of transcriptional and post-transcriptional regulation are required to define the domain of Hoxb4 expression. *Development* 130:2717-2728.
- Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* 121:333-346.
- Capovilla M, Botas J. 1998. Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Development* 125:4949-4957.
- Chambeyron S, Bickmore WA. 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev* 18:1119-1130.
- Charité J, de Graaff W, Consten D, Reijnen MJ, Korving J, Deschamps J. 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125:4349-4358.
- Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F. 1997. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386:84-87.
- Chen F, Capecchi MR. 1997. Targeted mutations in hoxa-9 and hoxb-9 reveal synergistic interactions. *Dev Biol* 181:186-196.
- Deschamps J, van Nes J. 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*. 132:2931-2942.
- Dony C, Gruss P. 1987. Specific expression of the Hox 1.3 homeo box gene in murine embryonic structures originating from or induced by the mesoderm. *EMBO J* 6:2965-2975.
- Duboule D. 1991. Patterning in the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* 1:211-216.

- Duboule D, Morata G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 10:358-364.
- Dupé V, Davenne M, Brocard J, Dollé P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rijli FM. 1997. In vivo functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:399-410.
- Epstein M, Pillemer G, Yelin R, Yisraeli JK, Fainsod A. 1997. Patterning of the embryo along the anterior-posterior axis: the role of the caudal genes. *Development* 124:3805-3814.
- Gamer LW, Wright CV. 1993. Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43:71-81.
- Garcia-Fernandez J. 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet.* 6:881-892.
- Garin E, Lemieux M, Coulombe Y, Robinson GW, Jeannotte L. 2006. Stromal *Hoxa5* function controls the growth and differentiation of mammary alveolar epithelium. *Dev Dyn* 235:1858-1871.
- Gaunt SJ, Coletta PL, Pravtcheva D, Sharpe PT. 1990. Mouse *Hox-3.4*: homeobox sequence and embryonic expression patterns compared with other members of the Hox gene network. *Development* 109:329-339.
- Gavalas A, Studer M, Lumsden A, Rijli FM, Krumlauf R, Chambon P. 1998. *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* 125:1123-1136.
- Gérard M, Chen JY, Gronemeyer H, Chambon P, Duboule D, Zákány J. 1996. In vivo targeted mutagenesis of a regulatory element required for positioning the *Hoxd-11* and *Hoxd-10* expression boundaries. *Genes Dev* 10:2326-2334.

- Gonzalez-Reyes A, Morata G. 1990. The developmental effect of overexpressing a Ubx product in *Drosophila* embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell*. 61:515-522.
- Gould A, Itasaki N, Krumlauf R. 1998. Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21:39-51.
- Gould A, Morrison A, Sproat G, White RA, Krumlauf R. 1997. Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* 11:900-913.
- Hogan BM, Beddington RS, Costantini F, Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press 2nd edition.
- Izpisúa-Belmonte JC, Falkenstein H, Dollé P, Renucci A, Duboule D. 1991. Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J* 10:2279-2289.
- Jeannotte L, Lemieux M, Charron J, Poirier F, Robertson EJ. 1993. Specification of axial identity in the mouse: role of the *Hoxa-5* (*Hox1.3*) gene. *Genes Dev*. 7:2085-2096.
- Kessel M, Gruss P. 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67:89-104.
- Kmita M, Duboule D. 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301:331-333.
- Kmita M, Fraudeau N, Héroult Y, Duboule D. 2002. Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of *Hoxd* genes in limbs. *Nature*. 420:145-150.
- Kondo T, Duboule D. 1999. Breaking colinearity in the mouse *HoxD* complex. *Cell* 97:407-417.
- Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201.

- Lamka ML, Boulet AM, Sakonju S. 1992. Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* 116:841-854.
- Larochelle C, Tremblay M, Bernier D, Aubin J, Jeannotte L. 1999. Multiple cis-acting regulatory regions are required for restricted spatio-temporal *Hoxa5* gene expression. *Dev Dyn.* 214:127-140.
- LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C. 2003. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* 17:2060-2072.
- Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 276:565-570.
- Lohnes D. 2003. The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* 25:971-980.
- Maconochie MK, Nonchev S, Studer M, Chan SK, Pöpperl H, Sham MH, Mann RS, Krumlauf R. 1997. Cross-regulation in the mouse *HoxB* complex: the expression of *Hoxb2* in rhombomere 4 is regulated by *Hoxb1*. *Genes Dev* 11:1885-1895.
- Mann RS, Hogness DS. 1990. Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell* 60:597-610.
- Manzanares M, Bel-Vialar S, Ariza-McNaughton L, Ferretti E, Marshall H, Maconochie MM, Blasi F, Krumlauf R. 2001. Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* 128:3595-3607.
- Meunier D, Aubin J, Jeannotte L. 2003. Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in *Hoxa5* mutant mice. *Dev Dyn.* 227:367-378.
- Moreau J, Jeannotte L. 2002. Sequence analysis of a *Hoxa4*-*Hoxa5* intergenic region including shared regulatory elements. *DNA Seq.* 13:203-209.

- Morrison A, Ariza-McNaughton L, Gould A, Featherstone M, Krumlauf R. 1997. HOXD4 and regulation of the group 4 paralog genes. *Development* 124:3135-3146.
- Nowling T, Zhou W, Krieger KE, Larochelle C, Nguyen-Huu MC, Jeannotte L, Tuggle CK. 1999. Hoxa5 gene regulation: A gradient of binding activity to a brachial spinal cord element. *Dev Biol.* 208:134-146.
- Oosterveen T, van Vliet P, Deschamps J, Meijlink F. 2003. The direct context of a hox retinoic acid response element is crucial for its activity. *J Biol Chem* 278:24103-24107.
- Papenbrock T, Peterson RL, Lee RS, Hsu T, Kuroiwa A, Awgulewitsch A. 1998. Murine Hoxc-9 gene contains a structurally and functionally conserved enhancer. *Dev Dyn* 212:540-547.
- Pöpperl H, Bienz M, Studer M, Chan SK, Aparicio S, Brenner S, Mann RS, Krumlauf R. 1995. Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon *exd/pbx*. *Cell* 81:1031-1042.
- Pownall ME, Tucker AS, Slack JM, Isaacs HV. 1996. eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* 122:3881-3892.
- Sharpe J, Nonchev S, Gould A, Whiting J, Krumlauf R. 1998. Selectivity, sharing and competitive interactions in the regulation of Hoxb genes. *EMBO J* 17:1788-1798.
- Shashikant CS, Bieberich CJ, Belting HG, Wang JC, Borbely MA, Ruddle FH. 1995. Regulation of Hoxc-8 during mouse embryonic development: identification and characterization of critical elements involved in early neural tube expression. *Development* 121:4339-4347.
- Spitz F, Gonzalez F, Duboule D. 2003. A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* 113:405-417.

- Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. 1996. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev* 55:91-108.
- Studer M, Gavalas A, Marshall H, Ariza-McNaughton L, Rijli FM, Chambon P, Krumlauf R. 1998. Genetic interactions between *Hoxa1* and *Hoxb1* reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* 125:1025-1036.
- Studer M, Pöpperl H, Marshall H, Kuroiwa A, Krumlauf R. 1994. Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of *Hoxb-1*. *Science* 265:1728-1732.
- Subramanian V, Meyer BI, Gruss P. 1995. Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 83:641-653.
- Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. 1994. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14:7340-7351.
- Tabariès S, Lapointe J, Besch T, Carter M, Woollard J, Tuggle CK, Jeannotte L. 2005. Cdx protein interaction with *Hoxa5* regulatory sequences contributes to *Hoxa5* regional expression along the axial skeleton. *Mol Cell Biol*. 25:1389-1401.
- Tuggle CK, Zákány J, Cianetti L, Peschle C, Nguyen-Huu MC. 1990. Region-specific enhancers near two mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes Dev* 4:180-189.
- van Nes J, de Graaff W, Lebrin F, Gerhard M, Beck F, Deschamps J. 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.
- Wang W, Malcolm BA. 1999. Two-stage PCR protocol allowing introductions of multiple mutation deletions and insertions using quick-change site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 26:680-682.

- Zákány J, Gérard M, Favier B, Duboule D. 1997. Deletion of a HoxD enhancer induces transcriptional heterochrony leading to transposition of the sacrum. *EMBO J* 16:4393-4402.
- Zákány J, Tuggle CK, Patel MD, Nguyen-Huu MC. 1988. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1:679-691.
- Zhao Y, Potter SS. 2002. Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev Biol* 244:21-36.



## **Chapitre IV :**

### **Comparative analysis of *Hoxa5* allelic series**

Sébastien Tabariès, Margot Lemieux and Lucie Jeannotte.

Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec, Canada, G1R 2J6

Manuscrit en préparation pour soumission dans : *Genesis*

## PRÉSENTATION

La caractérisation des souris homozygotes mutantes menée dans le laboratoire a montré que la perte de fonction du gène *Hoxa5* résulte en des transformations du squelette axial (entre la troisième vertèbre cervicale et la deuxième vertèbre thoracique) ainsi qu'en une mortalité périnatale élevée attribuable à une dysmorphogénèse du système respiratoire (Jeannotte et al., 1993 ; Aubin et al., 1997). De même, l'implication du gène *Hoxa5* a été montrée dans des anomalies qui affectent le système digestif (Aubin et al., 1999; Aubin et al., 2002a), la glande thyroïde (Meunier et al., 2003), la ceinture scapulaire (Aubin et al., 1998 ; Aubin et al., 2002b) et la glande mammaire (Garin et al., 2006).

Dans le but de pouvoir outrepasser le problème de la mortalité périnatale, nous avons entrepris la génération d'un mutant conditionnel du gène *Hoxa5*. Par ailleurs, le maintien de la cassette de sélection ayant déjà été démontré comme pouvant interagir avec des éléments de contrôle des gènes *Hox* voisins (Rijli et al., 1994), nous avons décidé d'employer une stratégie permettant de supprimer une éventuelle interférence liée à la présence de la cassette de sélection en l'éliminant par utilisation d'une recombinaison site-spécifique (Meyers et al., 1998; Farley et al., 2000).

La stratégie employée permet la génération de plusieurs variants alléliques soit un allèle où la cassette de sélection est encore présente (allèle *Hoxa5*<sup>fl<sup>ox</sup>neo</sup>), l'allèle conditionnel où la cassette de sélection a été excisée et dont le deuxième exon, qui contient la boîte homéo, est bordé de sites *loxP* (allèle *Hoxa5*<sup>fl<sup>ox</sup>ed</sup>) et l'allèle mutant où le deuxième exon du gène est éliminé (allèle *Hoxa5*<sup>Δ</sup>). Nous avons dans un premier temps voulu nous assurer que le maintien d'un site *frt* et d'un site *loxP* dans l'intron du gène n'avait aucune incidence sur la fonction du gène *Hoxa5* chez les individus *Hoxa5*<sup>fl<sup>ox</sup>ed/fl<sup>ox</sup>ed</sup>. Pour ce faire, nous avons entrepris une caractérisation des différents variants alléliques en comparaison avec les phénotypes rapportés pour la mutation nulle du gène *Hoxa5*. Ainsi, il appert que les allèles *Hoxa5*<sup>fl<sup>ox</sup>neo</sup> et *Hoxa5*<sup>Δ</sup> sont comparables à l'allèle nul puisqu'ils se caractérisent par une perte de production de la protéine Hoxa5, une mortalité périnatale élevée, une morphogénèse pulmonaire altérée ainsi que des transformations homéotiques du squelette axial dans la région cervico-thoraciques des individus homozygotes. Bien que ces résultats

aient été attendus pour les individus porteurs de l'allèle *Hoxa5*<sup>Δ</sup>, ils démontrent clairement une interférence de la cassette de sélection sur la fonctionnalité du gène *Hoxa5* chez les individus homozygotes porteurs de l'allèle *Hoxa5*<sup>floxneo</sup>.

En revanche, aucun phénotype n'a été observé chez les individus porteurs de l'allèle *Hoxa5*<sup>floxed</sup> démontrant ainsi que les séquences surnuméraires dérivant de la stratégie d'obtention de cet allèle n'ont pas d'effet sur la fonction du gène. De ce fait, ce mutant conditionnel devient un outil puissant pour la compréhension des différentes fonctions du gène *Hoxa5* dans les différents organes où il est exprimé. Ce mutant permet également de définir l'importance de la fonction du gène *Hoxa5* à chacun des stades du développement embryonnaire. De même, il sera possible de définir les fonctions du gène *Hoxa5* chez l'adulte et de vérifier si les phénotypes observés à ce stade sont une conséquence directe de la perte de fonction du gène lors du développement embryonnaire.

En plus du maintien de la colonie de souris, Margot Lemieux a procédé aux prélèvements des poumons et à l'observation des squelettes. Pour ma part, j'ai généré le vecteur de ciblage, génotypé et identifié les clones ES portant l'évènement de recombinaison, participé à la génération des souris mutantes, réalisé les études d'expression transcriptionnelle et protéique ainsi que les études d'histologie pulmonaire. L'écriture du manuscrit a été faite en étroite collaboration avec le Dr Jeannotte qui a également participé à l'analyse des données des squelettes.

## ABSTRACT

We have previously described a *Hoxa5* mutant null mouse line in which the viability at birth is reduced. Mutant mice have also revealed the critical role of *Hoxa5* in the specification of axial identity and in the ontogeny of organs where the gene is expressed. However, the early lethality and the multiple defects have limited the functional studies to specific cell types and mainly to embryonic stages. To circumvent this problem, we have generated mice harbouring a series of *Hoxa5* allelic variants. The conditional null allele (*Hoxa5*<sup>flox<sup>ed</sup></sup>), obtained by flanking the *Hoxa5* second coding exon with *loxP* sites, encodes the Hoxa5 protein as the wild-type allele and no phenotype is associated with. The allele is also efficiently converted into a null allele (*Hoxa5*<sup>Δ</sup>) by Cre-mediated recombination. Both the *Hoxa5*<sup>flox<sup>neo</sup></sup>, which contains the selection cassette, and the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> alleles are characterized by a loss of Hoxa5 protein production, a reduction in viability due to lung defects and specific skeletal homeotic transformations, phenotypes observed in the *Hoxa5* null mutants previously produced. These *Hoxa5* conditional null mice demonstrate the important roles of *Hoxa5* in organogenesis and axial patterning and will provide valuable tools for further uncovering the roles of *Hoxa5* in various processes *in vivo*.

## INTRODUCTION

*Hox* genes, an evolutionarily conserved gene family first described in *Drosophila* for their ability to cause segmental homeotic transformations, are recognized as master regulators involved in specifying positional information along the anterior-posterior (AP) axis of most animals (Krumlauf, 1994; Deschamps and van Nes, 2005). In mammals, 39 *Hox* genes are organized into four clusters (*HoxA* to *HoxD*) located on different chromosomes. The genomic organization of the *Hox* genes, including their position within the complex, has been conserved throughout evolution (Garcia-Fernandez, 2005). It reflects the colinear relationship existing between the position occupied by each *Hox* gene on the chromosome, its expression domain along the embryonic axes, and its temporal onset: genes at the 3' end of the clusters are expressed earlier and in more anterior regions than those located in more 5' positions (Duboule and Morata, 1994; Kmita and Duboule, 2003). Consequently, the *Hox* genomic arrangement is fundamental for the precise spatio-temporal regulation and function of each *Hox* gene during development. *Hox* RNA expression domains are both spatially restricted and overlapping, extending from specific anterior boundaries down to the caudal end of the embryo. However, the targeted mutations of murine *Hox* genes have shown that they exert their functions mainly in the anterior-most region of their expression domain (Stein et al., 1996; Aubin and Jeannotte, 2001).

We have previously generated a *Hoxa5* mutant mouse line (Jeannotte et al., 1993). The phenotypic characterization revealed the essential role of *Hoxa5* for the proper patterning of the cervical and upper-thoracic regions of the axial skeleton between prevertebrae (pv) 3 and 10 (Aubin et al., 1998), and for the correct formation of the pectoral girdle (Aubin et al., 2002b). The loss of *Hoxa5* gene function also perturbs respiratory tract development, which results in a high rate of perinatal lethality of the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> pups (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1997). Lungs from *Hoxa5*<sup>-/-</sup> survivors present an emphysema-like morphology due to impaired alveogenesis demonstrating the predominant role of this gene in lung development and maturation (Kinkead et al., 2004; Mandeville et al., 2006). In addition, *Hoxa5* is involved in the functional maturation of the midgut, in cell specification and

regionalization of the gastric epithelium (Aubin et al., 2002a), in the thyroid gland development and function (Meunier et al., 2003), and in the proliferation and differentiation of the mammary gland (Garin et al., 2006). While *Hoxa5* RNA is detected along the AP axis from the caudal end of the embryo to the pv3 anterior limit (Larochelle et al., 1999), the majority of the structures affected by the *Hoxa5* mutation are confined to its most-anterior expression level between pv3 and 10.

The *Hoxa5* mutation was obtained by introducing a *MC1neoA*<sup>+</sup> cassette into the *Hoxa5* homeobox sequence interrupting the DNA-binding homeo domain of the *Hoxa5* gene (Jeannotte et al., 1991). The mutation resulted in a null allele as demonstrated by the absence of production of the Hoxa5 protein in *Hoxa5*<sup>-/-</sup> specimens (Joksimovic et al., 2005). As for the *Hoxa5* gene, most of the *Hox* gene mutations initially reported were obtained by the insertion of a selection cassette in order to interrupt the activity of the targeted gene (Stein et al., 1996). However, several studies have shown that the maintenance of the selection cassette can have "neighborhood" consequences and hamper the correct interpretation of the resulting phenotypes. Indeed, *Hox* genes are closely clustered, the largest *Hox* complexes containing up to 11 genes and spanning less than 200 kb (Suemori and Noguchi, 2000). Thus, the insertion of a selection cassette into one locus could interfere with the transcriptional control of nearby genes as interactions between *Hox* gene regulatory sequences and the promoter of the selection cassette can occur (Olson et al., 1996). For instance, the *Hoxd10* mutation resulted in the ectopic expression of *Hoxd9* up to pv1, the gain of *Hoxd9* expression likely explaining the anterior skeletal transformations observed in *Hoxd10* mutants (Rijli et al., 1994). In the case of the *Hoxb2* mutation, it was associated with a decreased *Hoxb4* expression at the cervical level that might be responsible for the transformation of the second cervical vertebra and for the sternal defect (Barrow and Capecchi, 1996). In addition, *Hoxb1* expression was lost in the fourth rhombomere of *Hoxb2* mutants causing facial paralysis.

We have previously shown that the *Hoxa5* mutation does not perturb the expression of the adjacent *Hoxa4* gene (Aubin et al., 1998). In contrast, the introduction of the *neo* cassette in the *Hoxa4* locus causes a change in *Hoxa5* gene expression, the anterior limit of the *Hoxa5* expression domain being posteriorly shifted from pv3 to pv4/5 in *Hoxa4*<sup>-/-</sup>

mutants. This could explain the similarities in the skeletal homeotic transformations observed in *Hoxa4* and *Hoxa5* mutants (Aubin et al., 1998). Similarly, we have demonstrated that the insertion of the *neo* cassette in the *Hoxa5* locus interferes in *cis* with the *Hoxa5* promoter, with a caudal shift of the anterior boundary of *Hoxa5* expression from pv3 to pv10 (Aubin et al., 1998). Since an enhancer sequence essential for expression in mesodermal derivatives from the pv3-10 region was identified downstream of the *Hoxa5* coding sequences, a possible explanation could be that the presence of the *neo* cassette obstructs the access of the *Hoxa5* promoter to the downstream enhancer activity (Larochelle et al., 1999; Tabariès et al., 2005).

The use of targeting vectors allowing the conditional excision of the selection cassette by site specific recombination via the Cre-*loxP* or Flp-*frt* systems has demonstrated the influence of the selection cassette on *Hox* mutant phenotypes (Müller, 1999). For instance, the maintenance of the selection cassette in the *Hoxa2* conditional allele causes lethality at weaning age, while this phenotype is lost once the cassette is removed (Ren et al., 2002). In addition, the presence of the selection cassette causes a specific downregulation of *Hoxa2* gene expression in rhombomere 2 and a modification of the *Hoxa1* expression domain (Ren et al., 2002). Similarly, the generation of a *Hoxb8* conditional allele posteriorly shifted the *Hoxb9* and *Hoxb6* gene expression domains from one somite when the selection cassette is maintained in the *Hoxb8* locus. This change is not observed when the selection cassette is removed (Greer and Capecchi, 2002). Alternatively, the presence of the selection cassette can lead to the obtention of hypomorphic alleles, which could provide an interesting tool for the study of lethal mutations as shown for the *Fgfr1* and *Fgf8* genes (Meyers et al., 1998; Partanen et al., 1998).

Here we present the generation of *Hoxa5* allelic variants containing or not a selection cassette. To decipher if the selection cassette present in the *Hoxa5* initial mutant allele was responsible for the *Hoxa5* phenotypes reported to date, we have initiated a thorough characterization of the skeletal patterning and lung morphology of the mutant mouse lines obtained for each *Hoxa5* allelic variant and compared these phenotypes to our previous observations of the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mice.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Gene targeting and generation of germ line chimeras

A 8.9 kb genomic fragment, extending from the *BsrGI* site (-1658 bp) to the *EcoRI* site (+7200 bp), was subcloned into pBluescript SKII+ (Stratagene) and provided the basis for the design of the targeting vector. A *loxP* site flanked by *XbaI* and *NdeI* restriction sites (final length of 45 bp) was inserted downstream the *Hoxa5* exon 2 sequences into the *HpaI* site (+2790 bp) while a 1981 bp *SacI-KpnI* fragment from the pK-11 plasmid corresponding to the *loxP-frt-PGKneopolyA<sup>+</sup>-frt* cassette was inserted into the *NheI* site (+1127 bp) located in *Hoxa5* intron (Meyers et al., 1998; Bouchard et al., 2002). A diphtheria toxin-A (DT-A) negative selection cassette was added at the 3' end of the *Hoxa5* genomic sequences.

WW6 embryonic stems (ES) cells were electroporated with 20 µg of *NotI*-linearized targeting vector DNA as previously described and plated on *neo*-resistant feeder layers (Jeannotte et al., 1993; Bélanger et al., 2003). After 24 h, selection for G418 was applied (400 µg active product/ml; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). ES cell clones recovered from drug selection were screened by Southern blot analysis. Positive clones were injected into MF1- or ICR-blastocysts and transferred into pseudopregnant foster mothers to generate chimeras that were tested for germ line transmission as previously described (Jeannotte et al., 1993). Heterozygous progeny carrying the *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> allele were identified following Southern blot analysis using both 5' and 3' external probes (Fig. 4.1B). All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the institutional animal care committee. The analyses were done on animals from a mixed genetic background.

### Generation of the different *Hoxa5* allelic variants

Heterozygous mice carrying the *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> allele were crossed with FLPeR mice to remove the *PGKneo* selection cassette flanked by *frt* sites, generating mice carrying the *Hoxa5*<sup>floxcd</sup> allele (Fig 4.1A; Farley et al., 2000). *Hoxa5*<sup>floxcd</sup> heterozygous mice were then bred with *Sox11*Cre transgenic mice to remove the second *Hoxa5* exon flanked by *loxP* sites

to produce the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> allele (Hayashi et al., 2002). Heterozygous progeny from these matings were identified by Southern blot analysis with the 5' probe or by PCR genotyping (Fig. 4.1A-C).

### Genotyping of ES cells and mice

Genomic DNA was prepared from ES cells, mouse tail biopsies or embryonic tissues as described (Jeannotte et al., 1993). Purified DNA was digested with *EcoRI* and genotypes were determined by Southern blot with the 5' external probe *AccI-BsrGI* (between positions -1871 bp and -1658 bp). To verify if the integration of the targeting vector occurred by homologous recombination at both ends, DNA from the correctly targeted ES cell clones and heterozygous mice carrying the *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> allele was also digested with *XbaI* and the genotypes were confirmed with the 3' external probe *EcoRI-XbaI* (from position +7782 bp to position +8472 bp; Fig. 4.1A-B). A *neo* probe corresponding to the 1856 bp *XbaI-XbaI* fragment of the pK-11 plasmid was also used. For PCR analysis (Fig. 4.1A, C), primers a and b were designed to amplify fragments from the wild-type (471 bp) and *Hoxa5*<sup>floxed</sup> alleles (588 bp). The sequences of primers are: primer a: 5'-CAGCAGCGATCTGCATTCAC-3', primer b: 5'-GAAACGCACTGAAGCACTAC-3'.

### Northern analysis

PolyA<sup>+</sup> RNA from wild-type, *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup>, *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup>, *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> and *Hoxa5*<sup>-/-</sup> E12.5 embryos was isolated according to the TRIzol extraction (Invitrogen) and GenElute (Sigma) mRNA extraction protocols. 6 μg of each preparation was used to perform northern analysis. The 521-bp *SacI-BglIII* genomic fragment containing most of the translated region of exon 1 was used as riboprobe to detect endogenous *Hoxa5* transcripts. 1 μg of linearized plasmid was used for the riboprobe synthesis performed in 1X buffer (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT, 0.1 M spermidine). 50 μCi [<sup>32</sup>P] UTP, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP, 25 U of RNase inhibitor (Amersham) and 30 U of the required RNA polymerase were added for a final volume of 20 μl. The reaction was incubated for two hours at 40°C. To destroy the DNA matrix, 7 mM MgCl<sub>2</sub> and 4 U of DNaseI were added and the reaction was incubated for 15

min at 37°C. The reaction was stopped by adding 20 mM EDTA and 10 mM DTT. The riboprobe was then purified by phenol extraction and ethanol precipitation. Hybridization of the membrane was performed in 60% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NAH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7, 1% SDS, 0.7 g/ml of dextran sulfate, 0.1 mg/ml salmon sperm, 0.1 mg/ml transfer RNA, 20 µg/ml of polyA, and 2x10<sup>6</sup> cpm of riboprobe/ml of hybridization solution at 68°C for 16 hours. The membrane was then washed twice in 2X SSC at 50°C for 15 minutes. Non-specific hybridization was eliminated by a RNase treatment for 45 min at 37°C in 5 µg/ml of RNase A prepared in 2X SSC, followed by a wash for 30 min. at 80°C in 0.2X SSC, 1% SDS. Hybridization to a GAPDH probe for quality control and quantitation was also performed.

### **Western analysis**

E12.5 embryos were homogenized by sonication in 300 µl of ice cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glycerol 2-phosphate, 1 mM dithiothreitol, 10 µg/ml proteinase inhibitor cocktail (Sigma)). The extracts were centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4°C (Bélanger et al., 2003). Protein content was quantified using a protein bioassay reagent (Bio-Rad), and 60 µg of total protein lysate was resolved on a denaturing 10% SDS-PAGE, electrotransferred onto PVDF membrane (Amersham) and probed with a rabbit polyclonal antibody against Hoxa5 at a dilution of 1/500, which detects a specific Hoxa5 band at 37 kDa (Joksimovic et al., 2005). A non-specific band at 42 kDa was also present in all samples. For quantitation, membranes were also probed with a polyclonal anti-RasGAP (70.3) Rab, that was a crude polyclonal antisera raised against a GST fusion protein (Aubin et al., 2004). Incubation was done overnight at 4°C. The horseradish peroxydase-conjugated donkey anti-rabbit IgG was used as a secondary antibody at a dilution of 1/20000 (Vector Laboratories).

### **Histological analyses**

Lungs were dissected from E18.5 mouse embryos and treated as previously described (Aubin et al., 1997). Serial sections (4 µm) were collected, deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin and eosin according to standard procedures. For each allelic variant, at least three wild-type controls and three *Hoxa5* mutants were analyzed.

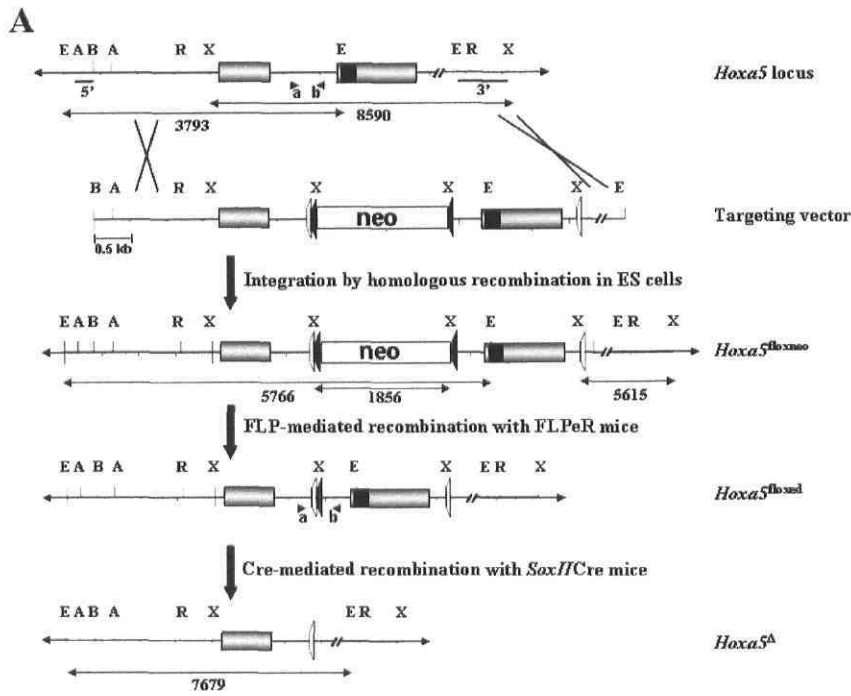
## Skeletal analysis

Skeletons were prepared from E18.5 embryos as described in Aubin et al. (1998). Skeletons were observed and left and right sides of each vertebra were scored independently for bilateral markers.

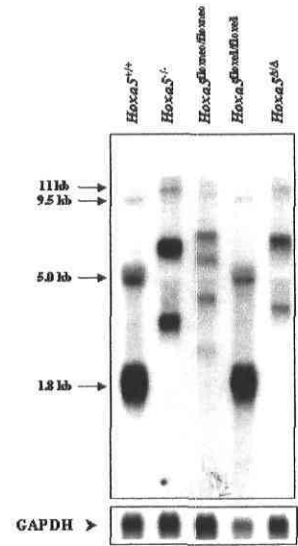
# RESULTS

## Generation of the *Hoxa5* conditional mutant mouse lines

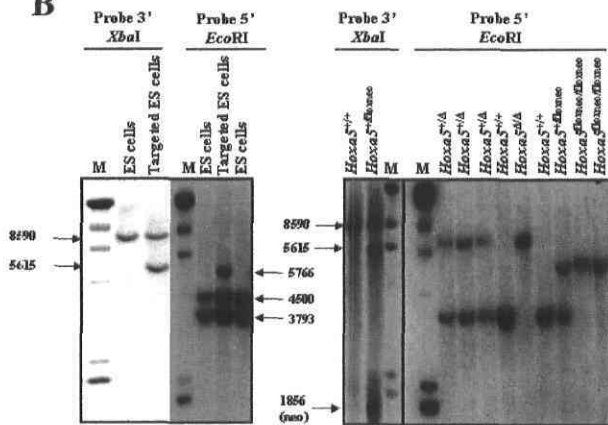
To generate a *Hoxa5* conditional mutation, we designed a targeting construct to insert a *PGKneo* selection cassette flanked by *frt* sites into the *Hoxa5* intron. In addition, the second exon of the gene, that contains the DNA-binding homeobox, was flanked by *loxP* sites (Fig. 4.1A). Homologous recombination events in G418-resistant ES cells were detected by Southern blot analyses. Genomic DNA from the recovered ES clones was digested with *EcoRI* restriction enzyme and membranes were hybridized with the 5' external probe flanking the 5'-end of the targeting vector (Fig. 4.1A). Digestion of wild-type and mutant alleles generated fragments of 3793 bp and 5766 bp, respectively (Fig. 4.1B). Out of the 732 G418-resistant ES cell clones screened, 13 contained the correctly targeted event (*Hoxa5*<sup>floxneo</sup> allele). Genomic DNA from these 13 clones was further digested with *XbaI* restriction enzyme and membranes were hybridized with the 3' external probe (Fig. 4.1A). Digestion of wild-type and mutant alleles generated fragments of 8590 bp and 5615 bp, respectively (Fig. 4.1B). For seven ES clones, the targeting vector was correctly integrated by homologous recombination on both sides and excluded any rearrangement at either end of the targeting site. Two of these clones (B and D) were microinjected into blastocysts and germline transmission of the targeted allele was obtained for both. This was confirmed by Southern analysis using both 5' and 3' probes (Fig. 4.1B). A *neo* probe was also used with genomic DNA from *Hoxa5*<sup>floxneo/+</sup> mice digested with *XbaI* restriction enzyme, and the expected 1856 bp fragment was detected (Fig. 4.1B). The heterozygous *Hoxa5*<sup>floxneo/+</sup> mice were bred with FLPeR mice to specifically remove the *PGKneo* selection cassette (Fig. 4.1A). Genomic DNA from these mice was genotyped by PCR analysis. The wild-type and *Hoxa5*<sup>flox<sup>ed</sup></sup> alleles generated fragments of 471 bp and 588 bp, respectively (Fig. 4.1C).



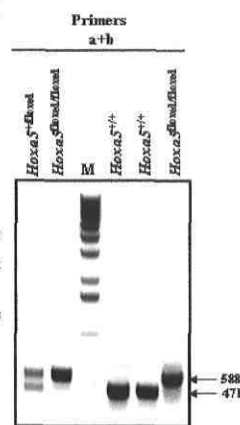
**D**



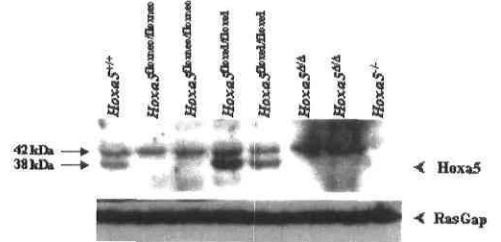
**B**



**C**



**E**



Finally, the *Hoxa5*<sup>floxed/+</sup> mice were crossed with *Sox11Cre*-expressing mice to generate *Hoxa5*<sup>Δ/+</sup> mutant mice (Fig. 4.1A). The resulting mice were genotyped by Southern analysis following a *EcoRI* digestion and hybridization of the membranes with the 5' probe (Fig. 4.1A). Digestion of wild-type and *Hoxa5*<sup>Δ</sup> alleles generated fragments of 3793 bp and 7679 bp, respectively (Fig. 4.1B). The heterozygous mice obtained for each mutant allele (*Hoxa5*<sup>loxneo</sup>, *Hoxa5*<sup>floxed</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ</sup>) were viable and proved to be fertile. Further characterization of the phenotype was performed for both mouse lines B and D and identical results were obtained. The data from line B will be presented.

*Hoxa5* heterozygous mice for each allelic variant were interbred to assess the consequences of the homozygous mutations in the animal. The resulting progenies were genotyped at weaning age by Southern blot analysis (Fig. 4.1B) or PCR (Fig. 4.1C). As expected, intercrosses between *Hoxa5*<sup>floxed/+</sup> animals indicated that the *Hoxa5*<sup>floxed</sup> allele was inherited in a mendelian fashion and that *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> mice were viable (Table 4.1). Northern analysis of RNA from E12.5 *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> embryos showed the production of all known *Hoxa5* transcripts, including the 1.8 kb, 5 kb, 9.5 kb and 11 kb forms (Fig. 4.1D; Jeannotte et al., 1993). Moreover, Western blot analysis confirmed that the production of Hoxa5 protein was not affected in E12.5 *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> specimens (Fig. 4.1E). Therefore, the presence of the *loxP* sites flanking *Hoxa5* exon 2 in the *Hoxa5*<sup>floxed</sup> conditional allele had no major incidence on *Hoxa5* gene expression.

It was shown that the *Hoxa5* null mutation previously produced causes a high rate of perinatal lethality (Jeannotte et al., 1993). A similar result was obtained for the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> allele, as only 8% of *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mice were obtained at weaning age instead of the expected 25% if the mutation was transmitted in a mendelian fashion (Table 4.1). Analysis of the *Hoxa5* transcripts revealed the absence of the 1.8 kb band, which corresponds to the two known *Hoxa5* exons encoding the Hoxa5 protein (Fig. 4.1D), suggesting that deletion of *Hoxa5* exon 2 impeded the expression of the transcript. This was further supported by the absence of the Hoxa5 protein detected in extracts from E12.5 *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> embryos (Fig. 4.1E). Thus, the homozygous deletion of *Hoxa5* exon 2 sequences caused a null mutation similar to the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutation with the complete lack of Hoxa5 protein (Joksimovic et al., 2005).

Table 4.1. Ratios of genotypes in litters from crosses of heterozygous *Hoxa5* mutants

Age	Number of litters	Number of pups	Genotype					
			wt		floxneo/+		floxneo/floxneo	
			living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)
E12.5	14	86	27 (31)	-	44 (51)	-	15 (18)	-
E18.5	9	59	19 (32)	-	20 (34)	-	20 (34)	-
3-4 weeks	22	126	38 (30)	3 (2)	46 (37)	3 (2)	14 (11)	22 (17)

Age	Number of litters	Number of pups	Genotype					
			wt		floxed/+		floxed/floxed	
			living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)
E12.5	17	124	39 (29)	-	60 (48)	-	28 (23)	-
E18.5	10	69	16 (23)	-	33 (48)	-	19 (28)	-
3-4 weeks	18	119	37 (30)	-	52 (44)	1 (1)	28 (24)	1 (1)

Age	Number of litters	Number of pups	Genotype					
			wt		$\Delta/+$		$\Delta/\Delta$	
			living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)	living (%)	dead (%)
E12.5	11	88	17 (19)	-	50 (57)	-	21 (24)	-
E18.5	9	72	22 (31)	-	32 (44)	-	18 (25)	-
3-4 weeks	13	102	22 (22)	-	51 (49)	3 (3)	8 (8)	18 (18)



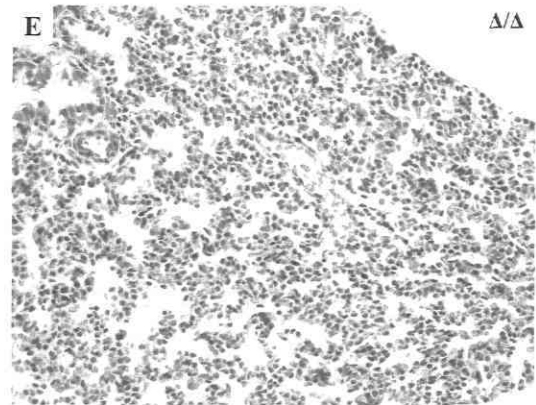
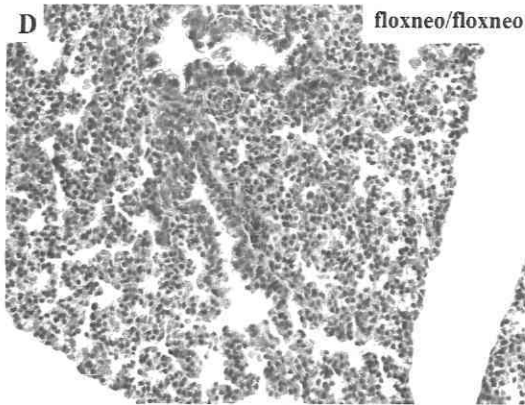
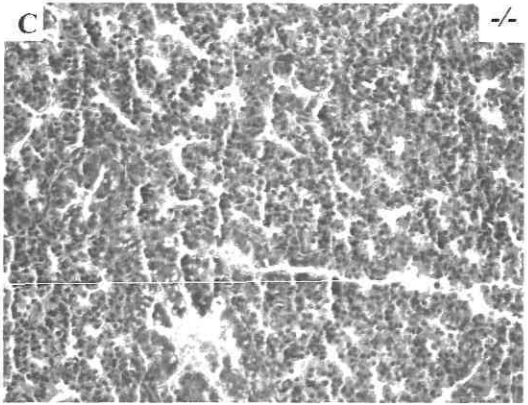
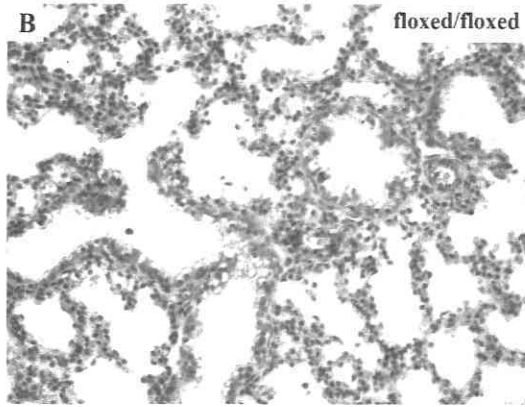
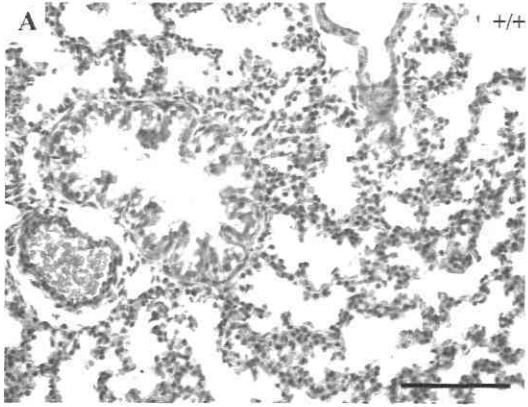
In the case of the *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> allele, the rate of recovery of *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> mice after birth was also greatly decreased with only 11% of *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> surviving animals instead of the expected 25% (Table 4.1). As for the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> allele, no 1.8 kb transcript and no Hoxa5 protein were detected in *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> specimens (Fig. 4.1D, E), indicating that this mutation caused a loss of *Hoxa5* function and suggesting that the presence of the selection cassette in the intron may interfere with *Hoxa5* gene expression.

To determine at what stage *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mice were dying, heterozygous animals were intercrossed and pregnant females were sacrificed at different times of gestation (Table 4.1). At E12.5 and E18.5, the numbers of embryos recovered for each genotype corresponded to the expected 1 :2 :1 ratio and no major anomaly was detected. A close monitoring of the litters revealed that the mortality occurred at birth. As for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutants, the absence of *Hoxa5* function led to a significant mortality at birth for the *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> pups.

The fraction of homozygous mutant animals of both sexes that survive to adulthood were proved to be fertile and did not present any phenotypic abnormalities. Taken together, these results indicated that the *Hoxa5*<sup>floxed</sup> allele did not perturb the expression of the gene and the production of the Hoxa5 protein and the homozygous mutant animals did not present any overt phenotype. In contrast, both the *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ</sup> alleles behave as a *Hoxa5* null allele with the loss of Hoxa5 protein production and a low survival rate at birth.

### **Impact of the *Hoxa5* mutations on lung morphology**

We have shown that the high rate of perinatal lethality of *Hoxa5*<sup>-/-</sup> pups was due to a defective development of the respiratory tract (Aubin et al., 1997). To determine if abnormal lung morphogenesis was associated with the *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mutations, we performed a comparative histological analysis of lungs from E18.5 control and *Hoxa5* mutants. At this stage, the *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mutant lungs presented a collapsed appearance similar to the one observed in *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutants (Fig. 4.2C-E). In contrast, lungs from *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> embryos are as expanded as controls with a normal morphology (Fig.4.2A-B). Thus, as for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutants, lung



morphogenesis was altered by the absence of *Hoxa5* function in *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mutants, which likely explained the death of the pups at birth.

### Homeotic transformations in the cervicothoracic region of *Hoxa5* mutant mice

The *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutants presented a variety of homeotic transformations covering the pv3-pv10 region of the axial skeleton (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). We also performed the skeletal analysis of E18.5 specimens for each allelic variant. The majority of *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> animals displayed skeletal anomalies restricted to the cervical-upper thoracic region and identical to those reported for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mutants while *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> specimens appeared comparable to controls (Table 4.2). The most predominant of these was the absence of tuberculum anterior on the 6<sup>th</sup> cervical vertebra (C6) in all *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens. A second frequent transformation was the alteration of C7, which in the majority (12/13) of *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and in all *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens, had associated rib structures. Most were found on both sides of the vertebra. In addition, the presence of an ectopic dorsal spinous process on the first thoracic vertebra (T1) was observed in all *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens. However, this transformation was also seen in a large proportion of control specimens. Abnormal dorsal processes were detected from C3 to C6 vertebrae in several *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens. However, these transformations are more visible in older animals once ossification has occurred (not shown; Aubin et al., 1998). Interestingly, abnormal acromions were detected only in few *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> specimens, suggesting either an effect of the genetic background or influence of the presence of the selection cassette. Finally, laryngotracheal malformations were totally penetrant in *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens with the fusion of the first tracheal rings to the cricoid, an abnormal banding pattern of the rings and a reduced dorsal extension of the cartilage along the trachea, indicating that dysmorphogenesis occurred along the entire respiratory tract.

Table 4.2: E18.5 Skeletal morphology according to the *Hoxa5* genotypes

	Genotype								
	wt	floxneo/+	floxneo/floxneo	wt	floxed/+	floxed/floxed	wt	$\Delta$ /+	$\Delta$ / $\Delta$
Tuberculum anterior on C6*									
Absent	-	-	25	-	-	-	-	1	20
Present	20	18	1	20	20	22	18	21	-
Ribs on C7*									
Absent	16	14	7	15	18	19	15	12	2
Present	4	4	19	5	2	3	3	10	18
Unilateral	2	2	5	3	2	3	1	2	2
Bilateral	1	1	7	1	-	-	1	4	8
Dorsal process on T1									
Absent	5	1	-	7	8	9	3	1	-
Present	5	8	13	3	2	2	6	10	10
Trachea									
Normal	10	9	-	9	10	11	9	10	-
Abnormal	-	-	13	1	-	-	-	-	10
Number of animals	10	9	13	10	10	11	9	11	10

\* left and right sides were scored independently

## DISCUSSION

In this study, we presented the generation of a *Hoxa5* conditional allele by homologous recombination in ES cells. Using the Cre-*loxP* and Flp-*frt* systems, we generated a series of allelic variants for the *Hoxa5* gene that were characterized according to the phenotypes previously reported for the *Hoxa5* null mutation (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998).

### The *Hoxa5*<sup>Δ</sup> allele is a null allele

To evaluate the efficiency of our strategy to generate a *Hoxa5* conditional allele and to validate that the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> mutation can reproduce the *Hoxa5* null mutation initially produced, we generated the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> allele via the use of the *Sox11Cre*-expressing mice. The *Sox11Cre* transgene targets recombination in all epiblast cells by E6.5 (Hayashi et al., 2002). As expected, the resultant *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mutant mouse strain presented a dramatic decrease in viability with 68% of the homozygotes dying at birth (Table 4.1). This lethality was comparable to that reported for the *Hoxa5* null mutation in an outbred background (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1997). Moreover, lungs from *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> embryos presented a compact appearance similar to that reported for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> specimens (Fig. 4.2C, E), indicating abnormal lung development that likely explains the high rate of perinatal lethality as observed for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mice (Aubin et al., 1997). The similarity in phenotype between the *Hoxa5*<sup>Δ</sup> and the *Hoxa5*<sup>-</sup> alleles can be extended to the skeleton with identical homeotic transformations affecting the cervical-upper thoracic region. One dissimilarity was the lack of phenotype regarding the dorsal spinous process of T2 for the *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> animals. This process was absent or reduced in *Hoxa5*<sup>-/-</sup> specimens. No clear explanation for this difference can be provided.

As observed for the *Hoxa5*<sup>-/-</sup> mice, the morphological transformations associated with the *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mice are confined to the pv3-10 region along the embryonic axis, a region expressing exclusively the 1.8 kb *Hoxa5* transcript, the latter corresponding to the two known exons encoding the Hoxa5 protein (Aubin et al., 1998). Expression of the Hoxa5 protein appears also localized to this axial domain, suggesting that the 1.8 kb transcript

encodes the *Hoxa5* protein (Joksimovic et al., 2005). The 1.8 kb transcript was not expressed in *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> embryos, as expected since exon 2 sequences are deleted. However, larger bands of 4.2, 7.5, 12 and 13.5 kb in length were detected on the northern blot and they did not correspond in size to the known larger *Hoxa5* transcripts of 5, 9.5 and 11 kb (Fig. 4.1D; Jeannotte et al., 1993). The larger *Hoxa5* transcripts originate from distal promoters located in the *Hoxa6-Hoxa7* intergenic region and from alternate splicing. They all use the polyadenylation signal of the *Hoxa5* second exon (Y. Coulombe and L. Jeannotte, unpublished). Therefore, deletion of *Hoxa5* exon 2 sequences may perturb the expression of the larger transcripts and lead to the use of cryptic polyadenylation sites. Thus, the lack of the 1.8 kb transcript may explain the loss of *Hoxa5* protein production in *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> specimens (Fig. 4.1D, E; Joksimovic et al., 2005).

### **The maintenance of the selection cassette interferes with *Hoxa5* gene function**

Our study of the *Hoxa5*<sup>flloxneo/flloxneo</sup> mutant mice revealed that the maintenance of the *PGKneo* selection cassette in the *Hoxa5*<sup>flloxneo</sup> allele resulted in a decreased viability of mutant pups with 56% of the homozygous dying at birth, which was comparable to that observed in *Hoxa5*<sup>-/-</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> mouse lines (Table 4.1). Again, this phenotype was accompanied with lung morphogenesis defects (Fig. 4.2D). Moreover, this mutant allele is associated to the loss of expression of the *Hoxa5* 1.8 kb transcript combined with the presence of transcripts of unexpected sizes (3.2, 4.5, 6, 8, 10.5 and 12 kb in length) on the northern blot as well as to the absence of *Hoxa5* protein production (Fig. 4.1D, E). These observations demonstrate that the *Hoxa5*<sup>flloxneo</sup> allele acts as a *Hoxa5* mutant allele suggesting that the maintenance of the selection cassette in the *Hoxa5* intron interferes with *Hoxa5* gene function by preventing the production of functional transcript and protein. Interference of the *PGKneo* cassette with the correct expression of the targeted and adjacent genes was observed for *Hox* genes due to the close juxtaposition of genes within *Hox* clusters in vertebrates (Rijli et al, 1994; Olson et al., 1996; Ren et al., 2002). The dynamic patterns of the *Hoxa5* gene expression is generated by a combination of positive and negative regulatory elements, located both upstream and downstream the gene, that differentially restrict the spatial, temporal and tissue-specific domains (Zákány et al., 1988; Tuggle et al., 1990; Larochelle et al., 1999; Tabariès et al., 2005). Among these regulatory

elements, the MES, located downstream the gene, is essential for *Hoxa5* paraxial and lateral plate mesoderm expression in the cervical and upper thoracic region between pv3-10 (Larochelle et al., 1999). Thus, one possible explanation for the phenotypes seen in *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> specimens would be that the *PGKneo* selection cassette, localized between the MES and the *Hoxa5* 1.8 kb promoter, specifically perturbs the transcription of the *Hoxa5* 1.8 kb transcript. The MES may act on the *PGK* promoter instead of the *Hoxa5* 1.8 kb promoter to lead to a loss of the *Hoxa5* expression in the pv3-10 domain resulting in a mutant phenotype. We have shown that in *Hoxa5*<sup>-/-</sup> specimens, in which a *MC1neoA*<sup>+</sup> cassette was inserted into the *Hoxa5* homeobox sequence, the *neo* transcripts were expressed in a normal *Hoxa5*-like expression pattern with an anterior boundary in the prevertebral column at the level of pv3, suggesting a specific interaction between the MES and the MC1 promoter (Aubin et al., 1998).

### **The 1.8 kb *Hoxa5* transcript is the functional *Hoxa5* transcript**

Four *Hoxa5* transcripts of 1.8 kb, 5 kb, 9.5 kb and 11 kb in length and encompassing the locus display a spatio-temporal differential expression profile. The three larger forms are expressed later during embryogenesis and in more posterior structures than the major 1.8 kb mRNA, suggesting that they are under different regulatory controls than the 1.8 kb transcript. The molecular characterization of the larger transcripts indicates that they share the same initiation site in the vicinity of the *Hoxa7* gene confirming the existence of a distal promoter (Y. Coulombe and L. Jeannotte, unpublished). Interestingly, the common feature between the three *Hoxa5* mutants mouse strains generated to date (*Hoxa5*<sup>-/-</sup>, *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> and *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup>) is the loss of expression of the 1.8 kb *Hoxa5* transcript associated with a loss of Hoxa5 protein production. The specific expression domain of the 1.8 kb transcript and the Hoxa5 protein in the prevertebral column corresponds to the pv3-pv10 region, a domain from which the majority of the *Hoxa5* phenotypes is deriving (Aubin et al., 1998; Joksimovic et al., 2005). Moreover, the *Hoxa5* gene expression in the pv3-pv10 region is driven by the MES regulatory sequence that selectively acts on the *Hoxa5* proximal promoter (S. Tabariès and L. Jeannotte, unpublished). Thus, it could be postulated that the 1.8 kb transcript is the sole *Hoxa5* transcript able to produce a Hoxa5 protein. Possible explanations for the extinction of the short *Hoxa5* transcript expression



include a perturbation of regional specific posttranscriptional control, an effect of the selection cassette which disrupts *Hoxa5* region-specific regulatory elements (as suggested above for the *Hoxa5*<sup>flxnco</sup> allele) or the requirement of the Hoxa5 protein for the specific expression of the 1.8 kb transcript in the pv3-pv10 domain as proposed by Aubin et al. (1998), and these possibilities are not mutually exclusive. However, it remains unknown how the larger *Hoxa5* transcripts contribute to *Hoxa5* gene regulation and function.

### **The *Hoxa5* conditional allele: a powerful tool to study the *Hoxa5* gene function**

As expected, offspring from heterozygous *Hoxa5*<sup>flxed/+</sup> matings were obtained in a mendelian fashion demonstrating that *Hoxa5*<sup>flxed/flxed</sup> mice were viable. No perturbation in the transcription pattern of the gene and protein production was observed. Furthermore, lung development appeared unaffected in homozygous specimens and no skeletal transformation could be associated with the allele. Taken together, these results demonstrated that the presence of the *loxP* sites in the *Hoxa5*<sup>flxed</sup> allele had no incidence on *Hoxa5* gene function. Thus, we now have in hand a mouse line in which *Hoxa5* gene function can be ablated by expression of the Cre recombinase. The use of conditional alleles allows for the specific disruption of genes in defined tissues and at distinct times. A conditional allele is useful to study the postnatal life function of a gene like *Hoxa5*, which presents a high rate of perinatal lethality. In addition, as the *Hoxa5* expression domain is broad, the use of a conditional allele could be very powerful for the assessment of tissue-specific *Hoxa5* gene function. The conditional *Hoxa5* allele will permit the identification of specific functions of the *Hoxa5* gene in organs where it is expressed without affecting its expression in other structures. Finally, as the *Hoxa5* gene is expressed in the mesenchyme of the lung (Aubin et al., 1997), the digestive tract (Aubin et al., 1998; Aubin et al., 2002a), the thyroid gland (Meunier et al., 2003) and the mammary gland (Garin et al., 2006), studies using mesenchyme-specific Cre expressing mouse lines will be particularly useful for defining the role of *Hoxa5* in mesenchymal-epithelial interactions. Indeed, mouse lines targeting Cre expression in the mesenchyme exist such as : the Nkx3-2 (Bapx1) promoter, which targets specifically in the gastric mesenchyme (Takamoto et al., 2005), the Col1 $\alpha$ 2 promoter, which directs expression in lung and intestine mesenchyme (Florin et al., 2004), and the fibroblast-specific promoter-1 (Fsp1), which allows expression in the interstitial

stroma of mature tissues throughout the mouse (Bhowmick et al., 2004).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Marcelle Carter for her technical skills in ES cell microinjection, Drs. J. Aubin and J. Charron for helpful comments on the manuscript, Dr. Andrew McMahon for the *Sox11Cre* mice and Dr. Maxime Bouchard for the pK-11 plasmid. This work was supported by a CIHR grant (MOP-15139 to L.J.). L.J. holds a Chercheur National Award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## REFERENCES

- Aubin J, Davy A, Soriano P. 2004. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* 18:1482-1494.
- Aubin J, Déry U, Lemieux M, Chailier P, Jeannotte L. 2002a. Stomach regional specification requires Hoxa5-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development*. 129:4075-4087.
- Aubin J, Jeannotte L. 2001. Implication des gènes Hox dans les processus d'organogenèse chez les mammifères. *Médecine/Sciences* 17:54-62.
- Aubin J, Lemieux M, Moreau J, Lapointe J, Jeannotte L. 2002b. Cooperation of Hoxa5 and Pax1 genes during formation of the pectoral girdle. *Dev Biol*. 244:96-113.
- Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Behringer RR, Jeannotte L. 1998. Transcriptional interferences at the Hoxa4/Hoxa5 locus: importance of correct Hoxa5 expression for the proper specification of the axial skeleton. *Dev Dyn*. 212:141-156.
- Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Bérard J, Jeannotte L. 1997. Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol*. 192:432-445.
- Barrow JR, Capecchi MR. 1996. Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* 122:3817-3828.
- Bélangier LF, Roy S, Tremblay M, Brott B, Steff AM, Mourad W, Hugo P, Erikson R, Charron J. 2003. Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 23:4778-4787.
- Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. 2004. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 303:848-851.

- Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubuser A, Busslinger M. 2002. Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* 16:2958-2970.
- Deschamps J, van Nes J. 2005. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*. 132:2931-2942.
- Duboule D, Morata G. 1994. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 10:358-364.
- Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. 2000. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 28:106-110.
- Florin L, Alter H, Grone HJ, Szabowski A, Schutz G, Angel P. 2004. Cre recombinase-mediated gene targeting of mesenchymal cells. *Genesis* 38:139-144.
- Garcia-Fernandez J. 2005. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet*. 6:881-892.
- Garin E, Lemieux M, Coulombe Y, Robinson GW, Jeannotte L. 2006. Stromal *Hoxa5* function controls the growth and differentiation of mammary alveolar epithelium. *Dev Dyn* 235:1858-1871.
- Greer JM, Capecchi MR. 2002. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron* 33:23-34.
- Hayashi S, Lewis P, Pevny L, McMahon AP. 2002. Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech Dev* 119 Suppl 1:S97-S101.
- Ioffe E, Liu Y, Bhaumik M, Poirier F, Factor SM, Stanley P. 1995. WW6: an embryonic stem cell line with an inert genetic marker that can be traced in chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7357-7361.
- Jeannotte L, Lemieux M, Charron J, Poirier F, Robertson EJ. 1993. Specification of axial identity in the mouse: role of the Hoxa-5 (Hox1.3) gene. *Genes Dev*. 7:2085-2096.

- Jeannotte L, Ruiz JC, Robertson EJ. 1991. Low level of Hox1.3 gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *off. Mol Cell Biol.* 11:5578-5585.
- Joksimovic M, Jeannotte L, Tuggle CK. 2005. Dynamic expression of murine HOXA5 protein in the central nervous system. *Gene Expr Patterns.* 5:792-800.
- Kinkead R, LeBlanc M, Gulemetova R, Lalancette-Hébert M, Lemieux M, Mandeville I, Jeannotte L. 2004. Respiratory adaptations to lung morphological defects in adult mice lacking Hoxa5 gene function. *Pediatr Res.* 56:553-562. Epub 2004 Aug 2004.
- Kmita M, Duboule D. 2003. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* 301:331-333.
- Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78:191-201.
- Larochelle C, Tremblay M, Bernier D, Aubin J, Jeannotte L. 1999. Multiple cis-acting regulatory regions are required for restricted spatio-temporal Hoxa5 gene expression. *Dev Dyn.* 214:127-140.
- Mandeville I, Aubin J, LeBlanc M, Lalancette-Hébert M, Janelle MF, Tremblay GM, Jeannotte L. 2006. Impact of the loss of Hoxa5 function on lung alveogenesis. *Am J Pathol.*
- Meunier D, Aubin J, Jeannotte L. 2003. Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in Hoxa5 mutant mice. *Dev Dyn.* 227:367-378.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. 1998. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136-141.
- Müller U. 1999. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82:3-21.
- Olson EN, Arnold HH, Rigby PW, Wold BJ. 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* 85:1-4.

- Partanen J, Schwartz L, Rossant J. 1998. Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for *Fgfr1* in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev* 12:2332-2344.
- Ren SY, Angrand PO, Rijli FM. 2002. Targeted insertion results in a rhombomere 2-specific *Hoxa2* knockdown and ectopic activation of *Hoxa1* expression. *Dev Dyn* 225:305-315.
- Rijli FM, Dollé P, Fraulob V, LeMeur M, Chambon P. 1994. Insertion of a targeting construct in a *Hoxd-10* allele can influence the control of *Hoxd-9* expression. *Dev Dyn* 201:366-377.
- Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. 1996. Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev* 55:91-108.
- Suemori H, Noguchi S. 2000. Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol* 220:333-342.
- Tabariès S, Lapointe J, Besch T, Carter M, Woollard J, Tuggle CK, Jeannotte L. 2005. *Cdx* protein interaction with *Hoxa5* regulatory sequences contributes to *Hoxa5* regional expression along the axial skeleton. *Mol Cell Biol*. 25:1389-1401.
- Takamoto N, You LR, Moses K, Chiang C, Zimmer WE, Schwartz RJ, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. 2005. COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development* 132:2179-2189.
- Tuggle CK, Zákány J, Cianetti L, Peschle C, Nguyen-Huu MC. 1990. Region-specific enhancers near two mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes Dev* 4:180-189.
- Zákány J, Tuggle CK, Patel MD, Nguyen-Huu MC. 1988. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1:679-691.

## Chapitre V : Discussion

Cette thèse avait pour but de répondre à deux objectifs principaux, la caractérisation de la séquence activatrice MES et la génération d'un mutant conditionnel pour le gène *Hoxa5*. D'une part, la caractérisation du MES, une séquence de 2.1 kb localisée en 3' du gène *Hoxa5* et responsable de l'expression du gène dans les dérivés mésodermiques de la région cervicale et thoracique supérieure, a été poursuivie (figure 1.13). L'absence du MES se traduit par une perte d'expression dans les structures dérivées du mésenchyme des plaques paraxiales et latérales au niveau cervical et thoracique. En fait, le MES dirige spécifiquement l'expression du gène dans la région située entre pv3 et pv10, dans les bourgeons des membres antérieurs, ainsi que dans le système urogénital (Larochelle et al., 1999). Pour ce faire, nous avons utilisé l'expertise en transgénèse du laboratoire pour définir les régions du MES responsables de l'expression spécifique du gène *Hoxa5* entre pv3 et pv10. Nous avons ainsi pu démontrer i) qu'une combinaison de séquences incluses dans le MES dirigent l'expression dans différentes structures, ii) qu'une de ces séquences est impliquée dans le positionnement de la frontière postérieure d'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* au niveau de pv10, et iii) que l'activité du MES se fait par l'intermédiaire de la liaison de plusieurs facteurs agissant en *trans*. Ces différents aspects ont fait l'objet d'une publication constituant le chapitre 2 (Tabariès et al., 2005) et d'un manuscrit en préparation correspondant au chapitre 3.

D'autre part, mes travaux de recherche m'ont amené à établir une lignée de souris porteuses d'une mutation conditionnelle pour le gène *Hoxa5* de façon à pouvoir étudier la fonction du gène de façon spatio-temporelle. Cette mutation a aussi été planifiée afin de pouvoir éliminer la cassette de sélection pour la résistance à la néomycine. En effet, cette dernière a été rapportée dans de nombreux cas comme pouvant interférer avec l'étude de la mutation du gène d'intérêt (Section 1.4). La génération et la caractérisation de ces divers variants alléliques font l'objet d'un manuscrit en préparation présenté au chapitre 4 de cette thèse.



Enfin, j'ai personnellement contribué à d'autres expérimentations liées à mon projet de recherche. Les résultats de ces expériences seront détaillés tout au long de ce chapitre de discussion.

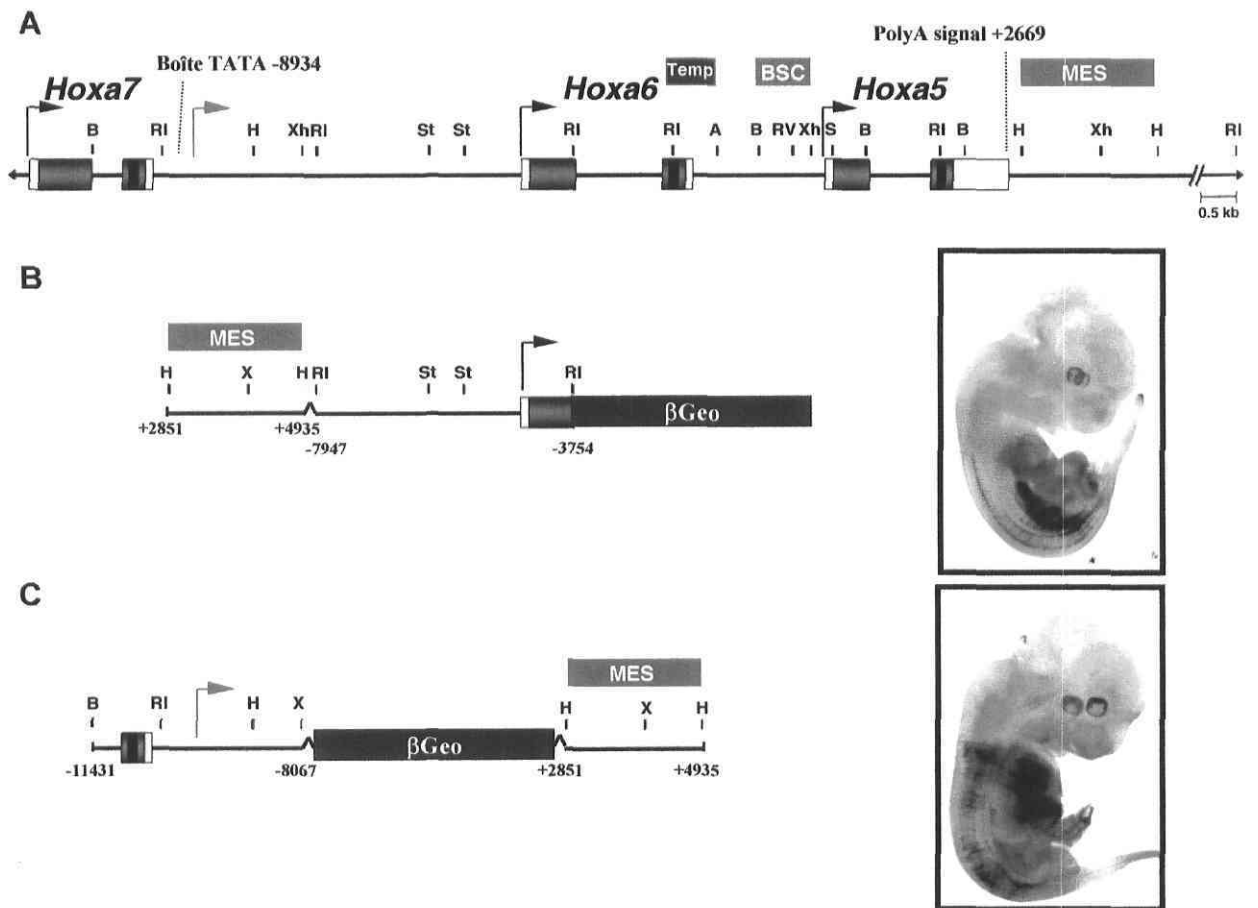
## 5.1 La transcription associée au locus *Hoxa5*

Par analyse Northern, quatre transcrits sont détectés à l'aide d'une sonde correspondant aux exons du gène *Hoxa5*. De ces quatre transcrits de 1.8 kb, 5 kb, 9.5 kb et 11 kb, le transcrit le plus abondant est celui de 1.8 kb qui correspond aux deux exons du gène (Jeannotte et al., 1993). Les trois longs transcrits s'initient plus en amont dans les séquences intergéniques *Hoxa6-Hoxa7* (Zákány et al., 1988; Larochelle et al., 1999). L'étude du MES présentée aux chapitres 2 et 3 de cette thèse montre l'importance de cette séquence régulatrice pour l'expression spécifique du gène *Hoxa5* entre pv3 et pv10 qui s'avère également être le domaine spécifique d'expression du transcrit de 1.8 kb. Dans le laboratoire, la caractérisation des différents transcrits *Hoxa5* a été entreprise afin de déterminer le lien existant entre l'action des séquences régulatrices décrites pour le gène et les domaines d'expression des différents transcrits.

### 5.1.1. Caractérisation des longs transcrits du gène *Hoxa5*

Par des essais d'amplification rapide des extrémités 5' des ADN complémentaires (RACE) utilisant différentes amorces, le site d'initiation des trois longs transcrits a pu être caractérisé. Ces transcrits s'initient tous au même site situé en 3' du gène *Hoxa7* à -8905 pb (figure 5.1, Yan Coulombe et Lucie Jeannotte, non publié). Au cours de cette étude, un transcrit pour le gène *Hoxa6* a été identifié (figure 5.1). Ce transcrit englobe les deux exons du gène *Hoxa6* ainsi que ceux du gène *Hoxa5* puisqu'aucun site de polyadénylation n'existe pour *Hoxa6*. Le transcrit *Hoxa6* utilise, de ce fait, le site de polyadénylation du gène *Hoxa5*. Le transcrit *Hoxa6* possède ainsi une importante homologie de séquence avec le transcrit de 5 kb du gène *Hoxa5*. Il avait été rapporté que le phénotype squelettique des souris *Hoxa6*<sup>-/-</sup> était similaire à celui observé chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, notamment avec la transformation de C7 en T1, mais avec une pénétrance et une expressivité plus faibles





(Kostic et Capecchi, 1994). Nos données suggèrent maintenant que le phénotype *Hoxa6*<sup>-/-</sup> pourrait être attribué à une interférence de l'expression du gène *Hoxa5* par la cassette de sélection insérée dans le gène *Hoxa6*. Pour ma part, j'ai activement participé à définir si les régions d'initiation de la transcription des longs transcrits et du transcrit *Hoxa6* possédaient une activité promotrice via des études de transgénèse (figure 5.2, Tabariès et Jeannotte, non publié). Les données obtenues démontrent que les séquences testées possèdent une activité promotrice fonctionnelle mais uniquement en présence d'une séquence activatrice (le MES dans le cas présent). Ces dernières observations et le fait que ces longs transcrits s'expriment de façon similaire au gène *Hoxa7*, soit dans des régions postérieures à pv10 le long de l'axe AP et plus tardivement que le transcrit majeur de 1.8 kb suggèrent un possible partage des séquences régulatrices du gène *Hoxa7* avec le promoteur distal du gène *Hoxa5* (Larochelle et al., 1999). Cependant, la caractérisation moléculaire des longs transcrits n'explique pas leur rôle. Il semble toutefois peu probable que l'organisme gaspille de l'énergie à la production de transcrits polyadénylés sans raison. De plus, la production de transcrits multiples est associée à de nombreux gènes *Hox*, notamment le gène *Hoxb5*, suggérant une fonctionnalité spécifique de ces transcrits multiples pour les gènes *Hox* (Krumlauf et al., 1987). Il peut être proposé que ces longs transcrits pourraient jouer un rôle de régulateur en accaparant la machinerie transcriptionnelle réduisant ainsi le niveau de transcription du transcrit majeur de 1.8 kb dans la région postérieure à pv10 où les longs transcrits sont spécifiquement exprimés. L'élucidation de la fonction des longs transcrits pourrait se faire, entre autre, par la génération d'une lignée de souris porteuses d'une mutation de la région promotrice commune des longs transcrits. Les phénotypes observés seraient, alors, la conséquence de la perte de fonction des longs transcrits puisque l'expression du court transcrit ne serait alors aucunement altérée.

Par ailleurs, plusieurs cadres de lecture ouverts existent le long des transcrits, suggérant que des protéines seraient susceptibles d'être produites à partir de ces différents transcrits (figure 5.1). Pour déterminer si l'ensemble de ces transcrits, certains étant bicistroniques ou présentant un très long 5' UTR, sont capables de générer des protéines, les ADNc correspondants pourraient être clonés dans des vecteurs d'expression et testés pour leur capacité à produire des protéines *in vitro*.

### 5.1.2. Le transcrit majeur du gène *Hoxa5*

Contrairement aux longs transcrits, le transcrit majeur de 1.8 kb, qui correspond aux deux exons du gène, semble avoir un rôle prépondérant dans la fonction du gène *Hoxa5*. En effet, nombre des phénotypes associés à la perte de fonction du gène *Hoxa5* (Section 1.5.2) sont associés à la perte spécifique de l'expression du court transcrit du gène *Hoxa5*. Ainsi, aucun des longs transcrits n'est exprimé dans la région de la colonne prévertébrale située entre pv3 et pv10 de même que dans la ceinture scapulaire, la glande thyroïde ou le système respiratoire, des régions d'où dérivent les phénotypes rapportés pour le gène *Hoxa5* (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998; Larochelle et al., 1999; Aubin et al., 2002b; Meunier et al., 2003). D'autre part, l'analyse différentielle des transcrits du gène *Hoxa5* suggère un processus de régulation distinct des deux promoteurs du gène. L'ensemble de ces données démontre l'importance d'une régulation fine de l'expression du court transcrit entre pv3 et pv10 pour la spécification des structures axiales et appendiculaires. De fait, nous avons montré dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse que la séquence MES cible spécifiquement l'expression du court transcrit entre pv3 et pv10 démontrant ainsi l'importance de cette séquence régulatrice dans la fonction du gène *Hoxa5*.

L'étude de la fonction du court transcrit est primordiale et des études ont récemment été entreprises dans ce sens. En effet, à l'aide d'un transgène exprimant le transcrit de 1.8 kb sous le contrôle de séquences régulatrices du gène *Hoxa5* dans la région spécifique comprise entre pv3 et pv10, soit sous le contrôle du MES, des souris transgéniques seraient produites. Le croisement des individus transgéniques avec des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> devrait se traduire par une complémentation des phénotypes mutants associés à la région pv3-pv10.

Outre l'identification du promoteur distal du gène *Hoxa5* responsable de la production des longs transcrits, l'étude des différents transcrits renforce la nécessité de l'étude des séquences régulatrices du gène *Hoxa5* et plus particulièrement de celles qui agissent spécifiquement sur le promoteur proximal du gène *Hoxa5*, telles les séquences MES et BSC, puisqu'elles sont impliquées dans la régulation adéquate de la production du transcrit fonctionnel de 1.8 kb du gène *Hoxa5*.

## 5.2 Les séquences régulatrices qui gouvernent l'expression du gène *Hoxa5*

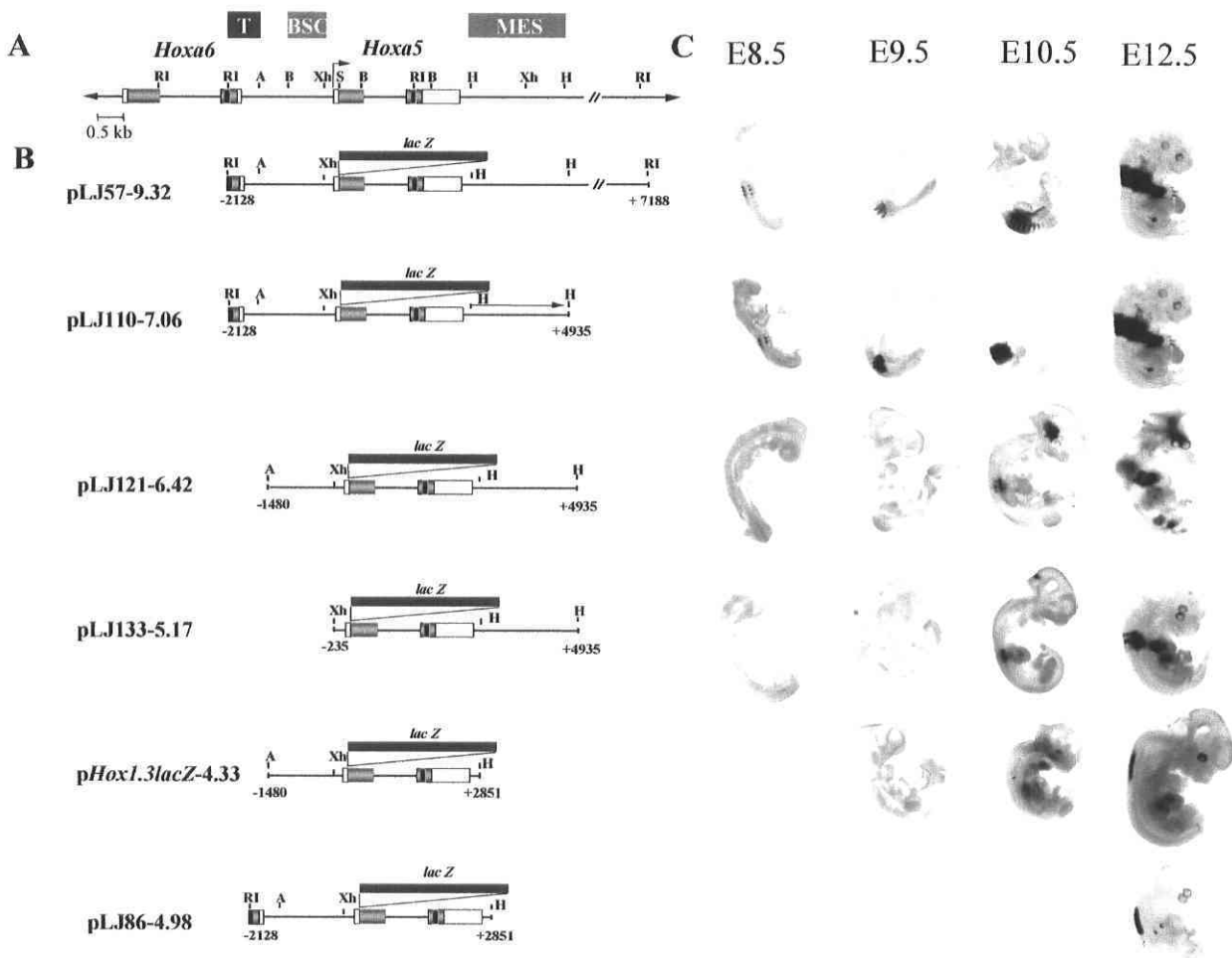
Jusqu'à présent, les études menées sur la régulation du gène *Hoxa5*, principalement par le groupe du Dr Tuggle et le nôtre, ont permis d'identifier quatre séquences régulatrices agissant pour définir l'expression du gène *Hoxa5*. Ces différentes séquences régulatrices agissent sur le promoteur proximal du gène et leur caractérisation est donc, tel que détaillée à la section 5.1.1., d'une grande importance pour la compréhension de la fonction du gène.

### 5.2.1. L'élément temporel

Des études préliminaires de transgénèse menées dans le laboratoire ont permis d'identifier un élément indispensable à l'expression précoce du gène (figure 5.2; Jeannotte et al., non publié). Cette séquence de 182 pb, située en 5' du gène, s'étend entre les positions -2128 pb et -1480 pb. Ainsi, en son absence, aucune expression des transgènes n'est détectée avant le stade E10.5 (figure 5.3). C'est d'ailleurs pour cette raison que dans les études de transgénèse présentées aux chapitres 2 et 3 de cette thèse, les embryons sont étudiés au stade E12.5. En effet, pour étudier l'impact spécifique du MES, les séquences situées en 5' du gène, dont fait partie l'élément temporel, sont absentes des constructions utilisées. Ceci a pour but de faciliter la visualisation des effets liés au MES. Des études sont toujours en cours dans le laboratoire afin de cartographier finement cette séquence responsable de l'expression temporelle du gène *Hoxa5*.

### 5.2.2. L'élément poumon/intestin

Comme rapporté à la section 1.2.2.1.2.1., la présence d'un élément régulateur positif, sensible à l'acide rétinoïque, dirige l'expression du gène *Hoxa4* au niveau du poumon, de l'intestin et du métanéphros (Packer et al., 1998). Cette séquence intergénique *Hoxa4-Hoxa5* permet aussi de diriger l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* au niveau de l'estomac, de l'intestin et des poumons (Moreau et Jeannotte, 2002). Ce patron d'expression indique que le fragment *XbaI* de 1471 pb localisé entre les positions +9350 pb et +10822 pb est partagé entre les gènes *Hoxa4* et *Hoxa5* pour l'expression dans

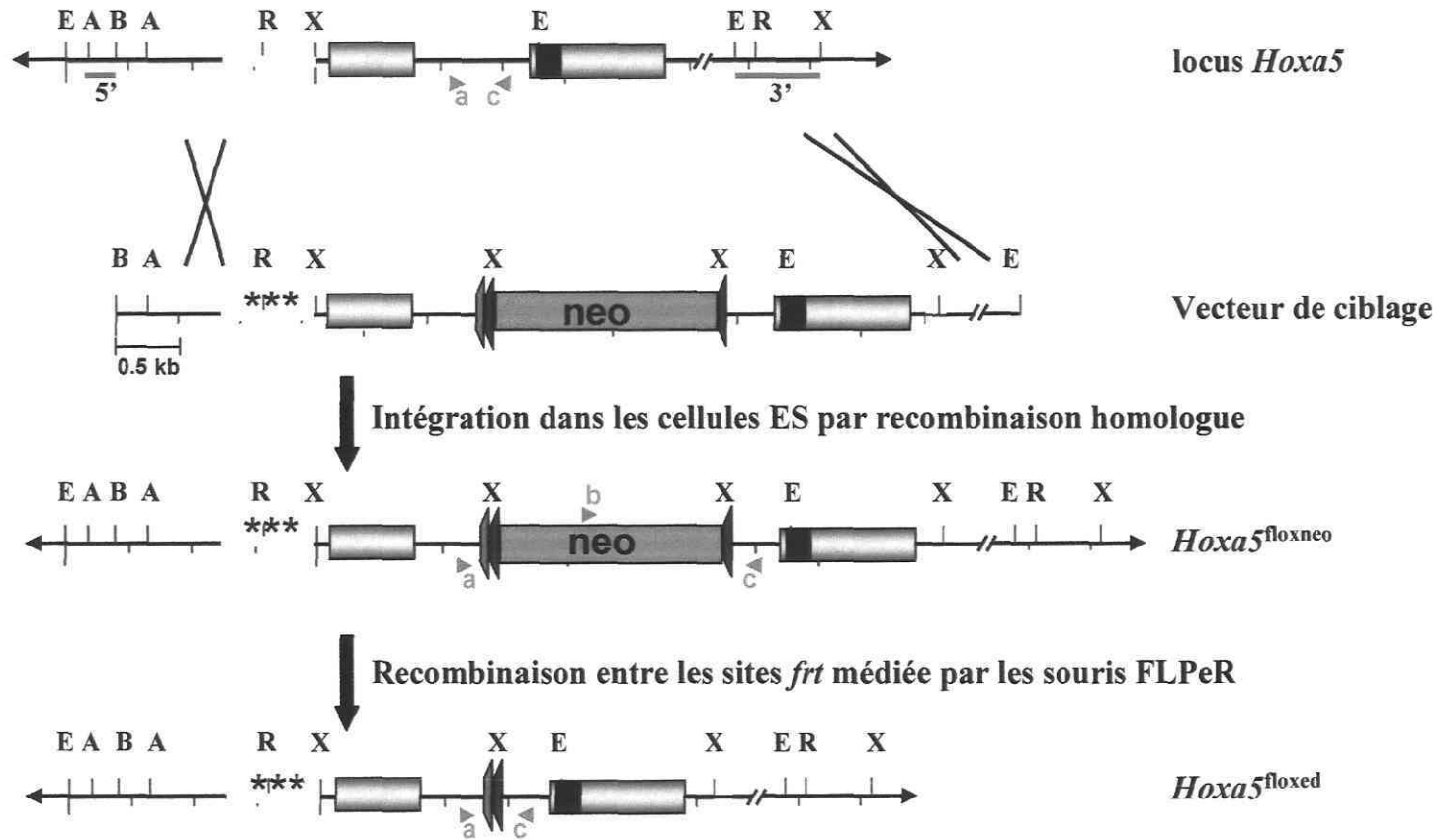




les systèmes respiratoire et digestif (figure 1.13, Moreau et Jeannotte, 2002). Contrairement à l'expression du gène *Hoxa4*, nous n'avons aucune évidence expérimentale de la nécessité du RARE pour l'expression du gène *Hoxa5* (Packer et al., 1998; C. Prudhomme et L. Jeannotte, non publié). De plus, les résultats obtenus par Packer et coll. (1998) peuvent être remis en cause puisqu'ils ont été obtenus en utilisant une séquence d'ADN dans laquelle une séquence de 282 pb est absente (Moreau et Jeannotte, 2002). Des travaux sont en cours dans le laboratoire pour définir cette région régulatrice et identifier les régions spécifiques à l'expression dans le poumon, l'estomac et/ou l'intestin. Par ailleurs, de nombreux résultats obtenus par des études de retard sur gel montrent que cette séquence peut être liée spécifiquement par des protéines présentes dans un extrait protéique embryonnaire (F.-A. Bérubé-Simard et L. Jeannotte, non publié).

### 5.2.3. L'élément BSC

L'élément BSC, décrit à la section 1.5.1.2., permet l'expression des transgènes dans la région dorsale du tube neural entre E11.0 et E13.0 (Zákány et al., 1988; Tuggle et al., 1990). Des essais de retard sur gel ont mis en évidence la présence de facteurs capables de lier spécifiquement trois sites AAATAA mais dont l'identité demeure toujours inconnue. La mutation de ces trois sites se traduit par une abolition de la liaison des facteurs et une perte de l'expression des transgènes dans le tube neural (Nowling et al., 1999). Pour approfondir l'importance de cet élément, des expériences ont été entreprises pour générer une lignée de souris porteuses de mutations au niveau des trois sites de liaison AAATAA. La stratégie de ciblage du gène est présentée à la figure 5.4. 1008 clones ES résistants à la néomycine ont été criblés. Après vérification de l'intégration et de la présence des mutations, deux clones se sont avérés positifs (S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). La génération de souris à partir de ces clones reste cependant à être complétée. Ces souris devraient devenir un outil très utile pour approfondir nos connaissances sur la fonction du gène *Hoxa5* au niveau du système nerveux. Par ailleurs, l'étude de ces souris pourrait mener à l'identification de gènes candidats codant pour les facteurs qui lient spécifiquement le BSC.



#### 5.2.4. L'élément MES

Le MES agit sur le promoteur proximal du gène *Hoxa5* et dirige spécifiquement, via une région de 892 pb située entre les positions +4043 pb et +4935 pb l'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* entre pv3 et pv10 (Chapitre 2, constructions 6 et 7, figures 2.1 et 2.2). Comme mentionné à la section 5.1.2, la région pv3-pv10 s'avère également spécifique à l'expression du transcrit fonctionnel de 1.8 kb du gène *Hoxa5*. En outre, de cette région dérivent les phénotypes squelettiques associés à la perte de fonction du gène *Hoxa5*. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés à la caractérisation de cet élément qui nous apparaît fondamental pour la compréhension de la fonction du gène *Hoxa5*.

D'un point de vue évolutif, il est très surprenant que la séquence *XhoI-HindIII* de 892 pb localisée à l'extrémité 3' du MES qui contient les différents éléments régulateurs étudiés dans cette thèse et qui apparaît primordial chez la souris soit si peu conservée entre les espèces. Ainsi, la comparaison des séquences génomiques entourant les gènes *Hoxa5* chez l'humain, chez le poisson zèbre, chez fugu ou chez le requin, montre, en utilisant la séquence murine comme matrice que cette séquence n'est conservée que chez l'humain. Une hypothèse serait que cette séquence régulatrice n'était pas présente dans le complexe originel et ne serait apparue qu'à la suite de la diversification des espèces. Par ailleurs, cette séquence pourrait avoir été requise chez la souris pour la spécification axiale de la région cervico-thoracique dont la complexité s'est accrue au cours de l'évolution.

L'étude de transgénèse présentée au chapitre 2 a révélé que le MES dirige spécifiquement l'expression du gène *Hoxa5* dans plusieurs structures. Des séquences en 3' dirigent l'expression dans les bourgeons des membres, les systèmes urogénital et digestif (Chapitre 2, figures 2.1 et 2.2). Ainsi, l'expression intestinale, qui est en partie dirigée par l'élément poumon/intestin décrit précédemment, est également sensible à une balance entre des éléments positifs et négatifs présents dans le MES. Ces résultats suggèrent donc une coopération entre plusieurs éléments régulateurs. Des observations similaires concernant le contrôle de l'expression dans les bourgeons des membres suggèrent que la coordination entre plusieurs éléments dispersés est nécessaire pour récapituler l'expression spatio-

temporelle complexe du gène *Hoxa5*. Ces travaux devront être poursuivis afin de définir plus finement les différents éléments régulateurs inclus dans le MES puisque le reste de notre étude s'est concentrée sur l'identification des éléments impliqués dans le positionnement de la frontière postérieure du domaine d'expression au niveau de pv10.

#### 5.2.4.1 Le fragment AvEc-164 pb

La délétion du fragment AvEc-164 pb dans le MES se traduit par une perte de la frontière postérieure au niveau de pv10 du domaine d'expression du gène *Hoxa5* (Chapitre 2, figures 2.1 et 2.2) suggérant que cet élément agit comme répresseur dans la partie postérieure de l'embryon. Ceci résulte en une limitation de la région fonctionnelle du gène *Hoxa5* à son domaine d'expression le plus antérieur. Tel que présenté à la figure 1.8, ce phénomène est généralisé à l'ensemble des gènes *Hox* puisque les études de perte de fonction se traduisent le plus souvent par des phénotypes restreints à la région la plus antérieure du domaine d'expression des gènes *Hox* (Aubin et Jeannotte, 2001). Ces observations sont d'ailleurs à l'origine des concepts du code *Hox* et de la prévalence postérieure. Bien qu'aucune évidence expérimentale n'ait été rapportée, ces concepts sont en adéquation avec l'ensemble des observations rapportées suite aux études de gain et de perte de fonction des gènes homéotiques. Le code *Hox*, qui serait à l'origine de la spécification des différentes structures embryonnaires le long des axes, stipule que du fait que chaque gène *Hox* est exprimé dans des régions discrètes mais qui se chevauchent, la combinaison spécifique des protéines *Hox* (qualitative et quantitative) dans une région donnée, définit une adresse génétique unique qui détermine les caractéristiques propres à cette même région (Kessel et Gruss, 1991; Duboule, 1998). D'autre part, le concept de prévalence postérieure a initialement été émis pour expliquer l'absence de phénotype associée à l'expression ectopique de gène *Hox* dans des parties postérieures à leur domaine d'expression fonctionnel. En revanche, lorsque l'expression ectopique a lieu dans des domaines plus antérieurs, on observe une duplication des structures (Duboule, 1991). Donc, l'expression d'un gène *Hox* plus postérieur prévaut fonctionnellement sur des gènes *Hox* plus antérieurs (Kmita et Duboule, 2003). Aucun mécanisme moléculaire expliquant cette prévalence postérieure n'a cependant été rapporté, permettant l'émission de diverses hypothèses pour expliquer le mécanisme suppresseur par lequel les gènes *Hox* postérieurs

dominant sur les gènes *Hox* antérieurs. L'un de ces mécanismes serait une déstabilisation des transcrits dans la partie caudale à leur domaine d'expression de façon à restreindre leur domaine d'expression comme démontré pour le gène *Hoxb4* (Brend et al., 2003). Comme proposé par Pearson et coll. (2005), la production dans des parties postérieures au domaine fonctionnel d'un gène *Hox*, de miRNAs qui ciblent spécifiquement la région 3' UTR de ces gènes pourrait, en partie, être à l'origine de cette déstabilisation des transcrits. Bien qu'il n'existe aucune évidence, il reste concevable que ce type de régulation post-transcriptionnelle existe pour le gène *Hoxa5*. Une autre hypothèse qui n'exclut pas la première, serait une régulation spécifique de l'expression des transcrits fonctionnels des gènes *Hox*. Nos travaux vont dans ce sens puisque des protéines Hox codées par des gènes plus postérieurs lient spécifiquement le MES sur la séquence AvEc-164 pb (Chapitre 3). Ces données sont également en accord avec celles obtenues lors de l'étude des transcrits chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> où l'insertion de la cassette de sélection se traduit par une perte spécifique du transcrit de 1.8 kb entre pv3 et pv10. Il est à noter que le gène *Hoxb5* présente également un patron d'expression résultant d'une combinaison de plusieurs transcrits et un domaine d'expression de la protéine restreint au domaine d'expression des transcrits le plus antérieur (Krumlauf et al., 1987; Sharpe et al., 1998). Il est donc possible de penser que, comme pour le gène *Hoxa5*, la région fonctionnelle du gène *Hoxb5* est dépendante d'un transcrit spécifique du gène *Hoxb5*.

#### 5.2.4.1.1. Cdx4 lie le fragment AvEc-164 pb

Nos travaux ont permis d'identifier une séquence clé dans le positionnement de la frontière postérieure du domaine d'expression du gène *Hoxa5*. Cette région de 25 pb, appelée Oligo1 et incluse dans le fragment AvEc-164 pb, contient deux sites consensus de liaison pour les protéines Cdx. Les protéines Cdx sont impliquées dans divers processus dont la spécification axiale en contrôlant l'expression des gènes *Hox* de différentes espèces (Mlodzik et al., 1990; Subramanian et al., 1995; Charité et al., 1998; Isaacs et al., 1998; Hunter et al., 1999). Contrairement à ce qui est le plus souvent rapporté dans la littérature, notre étude démontre une action négative des protéines Cdx sur l'expression du gène *Hoxa5* dans la partie caudale de l'embryon (Subramanian et al., 1995; Charité et al., 1998; Van den Akker et al., 2002). Chez Xénope, la surexpression de *Xcad3* se traduit par une

répression des gènes *Hox* postérieurs suggérant là aussi un rôle répresseur des protéines Cdx. Il est proposé que la capacité des protéines Cdx à promouvoir ou à réprimer l'expression de certains gènes *Hox* permettrait la définition des domaines d'expression pour le développement adéquat de la partie postérieure de l'organisme (Isaacs et al., 1998). Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré *in vivo* l'absence de modification du domaine d'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ* chez les individus mutants pour les fonctions *Cdx1* et/ou *Cdx2* (Chapitre 2, figure 2.5). Cette observation est surprenante compte tenu du fait que les mutations de ces gènes entraînent des transformations homéotiques comprises au niveau du domaine fonctionnel du gène *Hoxa5* (Subramanian et al., 1995; Chawengsaksophak et al., 1997; van den Akker et al., 2002). Si un rôle potentiel du gène *Cdx1* peut être exclu, il n'en est pas de même pour le gène *Cdx2* qui, de part sa létalité précoce, n'a été étudié que dans le cadre d'individus hétérozygotes (Chapitre 2, figure 2.5). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que la présence d'un allèle *Cdx2* fonctionnel soit suffisante à la régulation appropriée du gène *Hoxa5*. Toutefois, nos essais de retard sur gel en utilisant un anticorps anti-Cdx2 n'ont pas permis de révéler la présence de la protéine Cdx2 parmi les protéines qui lient la séquence Oligo1. Ainsi, parmi les trois protéines Cdx produites chez la souris, seule Cdx4 apparaît être impliquée dans cette restriction postérieure du gène *Hoxa5* (Chapitre 2, figure 2.6). Cependant, des trois protéines Cdx, Cdx4 est celle qui est exprimée le plus postérieurement et la frontière antérieure de son domaine d'expression correspondant au dernier somite formé s'avère postérieure à pv10 (Lohnes, 2003). On peut alors d'ores et déjà éliminer un modèle aussi simple qu'une répression spécifique du gène *Hoxa5* dans le domaine d'expression spécifique du gène *Cdx4*. De plus, l'expression du gène *Cdx4* est transitoire et cesse au stade E10.5, raison pour laquelle la liaison de Cdx4 sur le fragment AvEc-164 pb n'est détectée qu'avec un extrait protéique d'embryon au stade E9.5. Comme mentionné à la section 5.2.1, nos études de transgénèse sont menées au stade E12.5 suggérant donc que l'effet de Cdx4 sur la perte de restriction observée en transgénèse serait dû à un effet précoce de Cdx4 pour l'établissement de la frontière postérieure du gène *Hoxa5* et non sur sa maintenance. En effet, Cdx4 pourrait avoir pour fonction de définir la frontière postérieure au niveau de pv10 dès le stade E9.5. Puis à des stades ultérieurs, d'autres facteurs auraient alors pour fonction de maintenir cette frontière postérieure au niveau de

pv10. La meilleure façon de confirmer le rôle de *Cdx4* serait, comme nous l'avons fait pour les gènes *Cdx1* et *Cdx2*, une étude de l'expression de transgène *Hoxa5/lacZ* chez des souris mutantes pour la fonction du gène *Cdx4*. Lors de la publication du manuscrit présenté au chapitre 2, aucune lignée de souris mutantes pour le gène *Cdx4* n'était disponible. Or, ce n'est plus le cas depuis peu (van Nes et al., 2006). Contrairement à ce qui était attendu si la protéine Cdx4 avait un rôle prédominant lors de l'établissement de la frontière postérieure du domaine d'expression du gène *Hoxa5*, les individus *Cdx4*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de phénotypes au niveau du squelette axial (van Nes et al., 2006). En effet, la mutation du gène *Cdx4* devrait se traduire par une expression ectopique du gène *Hoxa5* dans la partie caudale de l'embryon qui pourrait s'accompagner de transformations homéotiques dans les domaines d'expression ectopique. Toutefois, en vertu du principe de prévalence postérieure (Section 1.2.2.1.2.7), on ne peut exclure la possibilité d'une répression fonctionnelle du gène *Hoxa5* au niveau des sites d'expression ectopique. Il est donc nécessaire d'étudier le patron d'expression du gène *Hoxa5* chez les individus *Cdx4*<sup>-/-</sup>. Des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec le groupe du Dr Jacqueline Deschamps ne montrent aucune variation dans le domaine d'expression du gène *Hoxa5* chez les individus *Cdx4*<sup>-/-</sup> au stade E8.5 (J. Deschamps et L. Jeannotte, non publié). Il serait souhaitable d'étoffer cette étude en analysant des stades du développement plus tardifs avant d'en tirer des conclusions.

#### **5.2.4.1.2. Les protéines Hox orthologues à la protéine AbdB lient le fragment AvEc-164 pb**

Dans le chapitre 3, nous avons également montré que des protéines Hox codées par des gènes situés plus en 5' des complexes étaient capables de lier spécifiquement le fragment AvEc-164 pb. Il s'est aussi avéré que cette liaison ne se faisait non pas sur le site de liaison pour les protéines Hox identifié par analyse bioinformatique, mais sur les deux sites préalablement décrits dans le chapitre 2 pour la liaison des protéines Cdx. Cependant, compte tenu du fait que les protéines Cdx et Hox sont des facteurs de transcription à domaine homéo, les sites consensus de liaison reconnus par ces facteurs sont similaires. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la séquence de 25 pb mais soulève de nombreuses interrogations. La principale d'entre elles concerne la façon dont les protéines Cdx et/ou Hox agissent sur ces deux sites. Plusieurs scénarios pourraient être proposés.



L'un d'entre eux serait une compétition de liaison entre les protéines Hox et les protéines Cdx pour lier cette séquence et/ou une action de l'un ou l'autre dépendamment de son domaine d'expression. Chez Xénope, la surexpression de *Xcad3* se traduit par une répression des gènes *Hox* postérieurs (Isaacs et al., 1998). Une répression similaire des gènes *Hox* postérieurs pourrait conduire à des domaines d'action spécifiques des protéines Cdx et Hox. Par ailleurs, la présence de deux sites fonctionnels permet d'envisager une coopération entre les protéines Hox et les protéines Cdx. Finalement, on peut concevoir que la protéine Cdx4 serait impliquée dans l'établissement de la frontière postérieure du domaine d'expression et que les protéines Hox, générées par les gènes localisés plus en 5' des complexes (exprimés plus tardivement), seraient responsables de son maintien. Le MES spécifiant la région d'expression du transcrite fonctionnel du gène *Hoxa5*, une action des protéines Hox plus postérieures sur le MES résulterait en une répression de l'expression du transcrite majeur de 1.8 kb dans la partie caudale à pv10.

L'étude présentée au chapitre 3 révèle que parmi les protéines Hox capables de lier la séquence Oligo1 (*Hoxa9*, *Hoxb9*, *Hoxd9*, *Hoxd10*, *Hoxd11* et *Hoxd12*; Chapitre 3, figure 3.3), seule la protéine *Hoxb9* a été montrée comme présente parmi les protéines d'un extrait embryonnaire capables de lier le fragment AvEc-164 pb. Or, le gène *Hoxb9* présente une frontière antérieure de son domaine d'expression au niveau de pv10 (Chen et Capecchi, 1997). Ainsi, ces données sont en adéquation avec un rôle de répresseur de l'expression du gène *Hoxa5* par la protéine *Hoxb9* au niveau du domaine d'expression du gène *Hoxb9*. De plus, ces données permettent d'étayer le concept de prévalence postérieure mentionné à la section 5.2.4.1. Une action répressive de la protéine *Hoxb9* sur le MES pourrait résulter en une abolition de l'expression du transcrite majeur de 1.8 kb dans la partie caudale à pv10. Ainsi, l'expression du gène *Hoxb9* prévaudrait fonctionnellement sur le gène *Hoxa5* dans les structures postérieures à pv10. Cependant, cette étude a été limitée par la disponibilité en vecteur d'expression et en anticorps spécifiques fonctionnant en essai de retard sur gel. Il demeure possible que d'autres protéines Hox, non étudiées au chapitre 3 soient capables de lier spécifiquement le fragment Oligo1. Enfin, parmi les gènes *Hox* non testés, le gène *Hoxb7* présente une frontière antérieure d'expression au niveau de pv11 (Burke et al., 1995). Il serait donc pertinent d'étudier la capacité de la protéine *Hoxb7* à lier le fragment AvEc-164 pb.

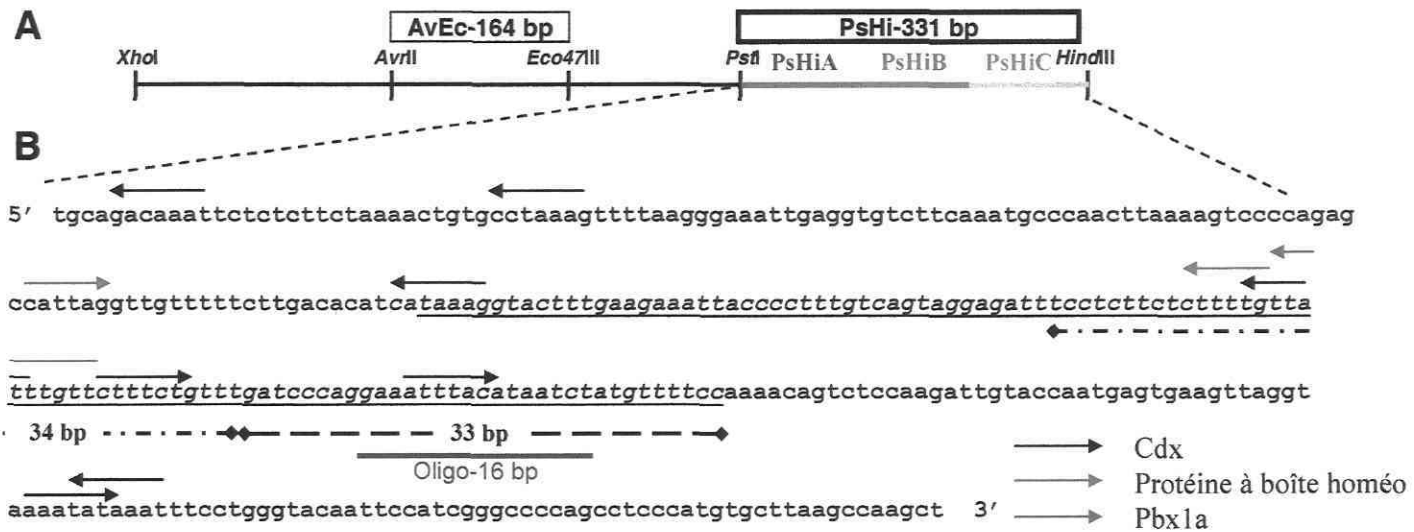
Comme dans le cadre de l'étude présentée au chapitre 2, il serait envisageable d'étudier l'impact de la mutation des gènes *Hox*, plus particulièrement des gènes *Hoxb9* et *Hoxb7*, sur le patron d'expression des transgènes *Hoxa5/lacZ*. Toutefois, ce type d'étude est assez fastidieux et long. Une alternative serait une approche d'immunoprécipitation de la chromatine en utilisant les anticorps contre les protéines *Hoxb9* et *Hoxb7* pour déterminer si ces protéines lient le MES (Dryer et Covey, 2006).

#### **5.2.4.1.3. Les autres facteurs agissant sur le fragment AvEc-164 pb**

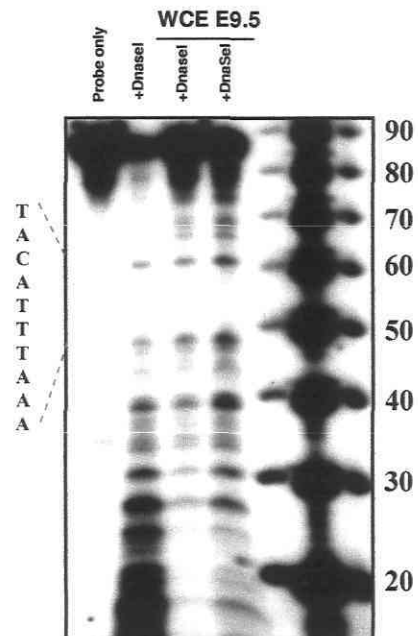
Il appert évident que la caractérisation du fragment de 164 pb doit être poursuivie. En effet, les études de transgénèse montrent que la mutation ponctuelle des deux sites de liaison des protéines Cdx (Chapitre 2, construction 12, figures 2.1 et 2.2) ou la délétion de la séquence Oligo1 (Chapitre 3, construction 1, figures 3.1 et 3.2) se traduisent par un effet moindre sur la perte de la restriction postérieure que la délétion complète du fragment AvEc-164 pb (Chapitre 2, construction 8, figures 2.1 et 2.2). Ces données suggèrent l'action d'autres facteurs sur l'élément AvEc-164 pb qui, en combinaison avec l'action des protéines Cdx et/ou Hox sur l'Oligo1, contribuent à la régulation spatiale du gène *Hoxa5*. De plus, les études de retard sur gel utilisant le fragment AvEc-164 pb comme sonde et l'extrait total d'embryon à différents stades du développement montrent la liaison de plusieurs facteurs. Parmi les candidats potentiels, l'analyse TRANSFAC révèle un site de liaison potentiel pour les protéines Pbx (Section 1.2.2.1.2.5). Toutefois, aucune des protéines Pbx1a ou Pbx1b produites *in vitro* et testée par EMSA ne lie le fragment AvEc-164 pb (S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). Une approche pour identifier ces autres facteurs serait la mise en place de CHIP-on-Chip (Testa et al., 2005). Cette méthode permet l'étude des protéines interagissant avec l'ADN en combinant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine avec la méthode des puces à ADN. La limitation de cette dernière approche serait la disponibilité d'anticorps reconnaissant les facteurs qui lient le fragment AvEc-164 pb.

#### 5.2.4.2 Le fragment PsHi-331 pb

La caractérisation du MES a également permis d'identifier le fragment de 331 pb situé à l'extrémité 3' du MES. Contrairement au fragment AvEc-164 pb, le fragment PsHi-331 pb possède des propriétés « enhancer » (Chapitre 3, figures 3.1 et 3.2). Toutefois, ces propriétés n'ont été démontrées que dans le cadre du promoteur proximal du gène *Hoxa5*. Une étude élargie de ces propriétés sur un promoteur d'un gène hétérologue tel *Hsp68* permettrait de confirmer ce résultat. Par des analyses de retard sur gel, j'ai montré que des protéines d'embryon pouvaient lier le fragment PsHi-331 pb via un motif de 16 pb (Chapitre 3, figure 3.6). De plus, une étude par empreinte à la DNase I a confirmé la liaison d'un facteur sur le motif de 16 pb qui contient un site de liaison potentiel pour les protéines Cdx (figure 5.5, S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). Toutefois, les protéines Cdx produites *in vitro* sont incapables de lier le motif de 16 pb (S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). Ceci est en accord avec le fait qu'aucune compétition n'a été observée en retard sur gel lorsque le fragment SIF1, une cible connue des protéines Cdx, est utilisé comme compétiteur (Chapitre 3, figure 3.6) ; (Suh et al., 1994). La présence de ce site de liaison potentiel pour les protéines Cdx suggère que la protéine impliquée dans la liaison au motif de 16 pb contient un domaine homéo. Nous avons donc testé la capacité de liaison de diverses protéines à domaine homéo, telles que *Hoxa5*, *Hoxd9*, *Hoxd10*, *Hoxd11*, *Pbx1a* et *Pbx1b*. Malheureusement, aucune des protéines produites *in vitro* ne lie le motif de 16 pb (S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). A ce jour, le facteur agissant sur le motif de 16 pb n'a pas encore été identifié. D'autres stratégies ont été envisagées afin d'identifier ce facteur. L'une d'entre elles consiste à ajouter un groupement biotine à l'extrémité du fragment d'intérêt (Gabrielsen et Huet, 1993). Ce fragment est incubé avec l'extrait protéique pour que le facteur se lie avec le fragment. Ce mélange est ensuite mis en présence de billes enrobées de streptavidine (Dynal Biotech) capables de lier la biotine. Il est ainsi possible de soustraire le facteur lié au fragment des autres protéines présentes dans l'extrait. Avec cette approche, deux bandes ont été envoyées pour analyse en spectroscopie de masse (figure 5.6). La comparaison des résultats obtenus avec les fragments d'intérêt (67 pb et PsHiB-112 pb) et un fragment contrôle ne nous a pas permis d'identifier le facteur agissant sur le motif de 16 pb. Ceci est dû à une limitation expérimentale provenant de la



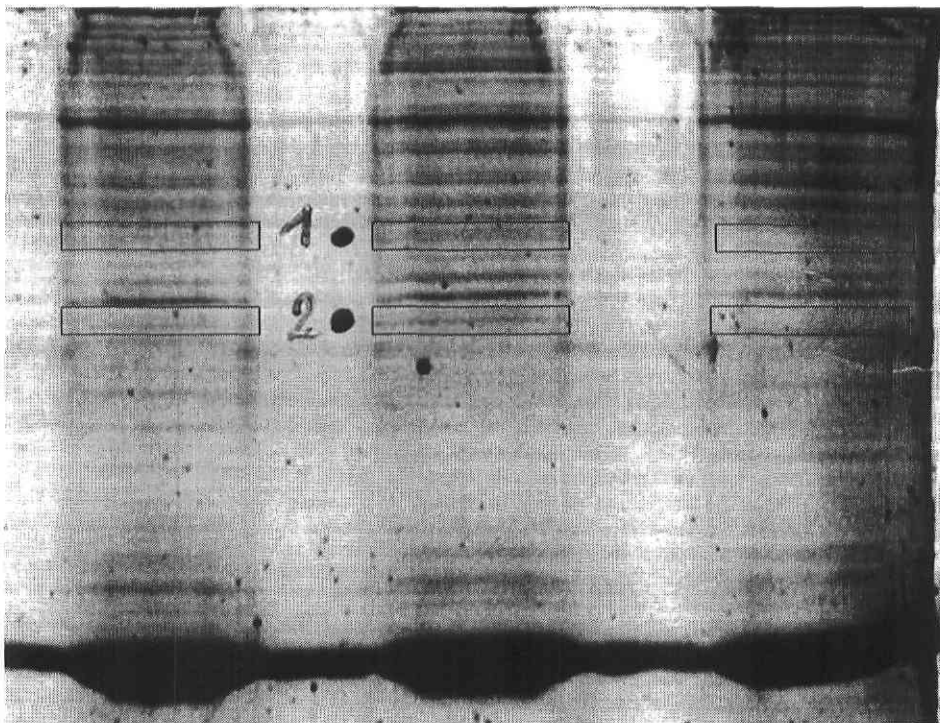
**C 67 bp sequence**



67 pb

PshIB-112 pb

Ctrl



## Bande #1

	67 bp	PsHiB-112 bp	Ctrl
facteur d'élongation Tu			
isoform 1 de protéine TAR liant l'ADN			
N-myc			
protéine de liaison à l'ADN TAR			
protéine hypothétique LOC432987			
protéine inconnue 12845960=ribonucléoprotéine nucléaire A3			
protéine inconnue 12859782			
protéine inconnue 26324736			
protéine inconnue 26325118			
protéine inconnue 74195737			
protéine inconnue 74200533			
protéine inconnue 74204203=facteur d'élongation eucaryotique			
protéine mKIAA1991			
ribonucléoprotéine nucléaire A/B			
ribonucléoprotéine nucléaire D			

## Bande #2

	67 bp	PsHiB-112 bp	Ctrl
facteur d'élongation Tu			
protéine ribosomale S3			
protéine hypothétique LOC319555			
protéine hypothétique LOC432937			
protéine inconnue 12851918=protéine ribosomale S4 du 40S			
protéine inconnue 12859567=ribonucléoprotéine A0			
protéine inconnue 12859782			
protéine inconnue 26324736			
protéine inconnue 26354020			
protéine ribosomale S2 du 40S			
represseur transcriptionnel SIN3B			
ribonucléoprotéine nucléaire A1=TIS			
ribonucléoprotéine nucléaire A2/B1			

préparation de l'extrait protéique qui présente beaucoup de liaisons non spécifiques (Tableau 5.1). Une autre approche consisterait à utiliser la technique du « Yeast-One-hybrid » avec le fragment PsHiB-112 pb ou le motif de 16 pb comme appât couplé à un gène rapporteur pour cribler des banques d'expression riches en protéines à domaine homéo.

En plus des constructions étudiées dans le chapitre 3, il pourrait être informatif d'étudier l'impact de la délétion du motif de 16 pb dans le contexte d'un MES entier et de comparer les effets obtenus avec ceux rapportés avec la construction 2 du chapitre 2 (délétion du fragment PsHi-331 pb).

#### **5.2.4.3 L'action du MES est spécifique au promoteur proximal du gène *Hoxa5***

Parallèlement aux résultats de caractérisation des éléments régulateurs inclus dans le MES et nécessaires au positionnement de la frontière postérieure du domaine d'expression du gène *Hoxa5*, différents résultats suggèrent une spécificité d'action du MES pour le promoteur proximal du gène *Hoxa5*. En effet, lorsque le MES est testé pour sa capacité à activer le promoteur hétérologue *hsp68* (construction 8 dans Larochelle et al., 1999), le patron d'expression des transgènes diffère de celui observé dans nos études puisqu'il présente une expression qui s'étend jusqu'à l'extrémité caudale de l'embryon. Le même phénomène a été observé lors de l'étude de l'activité promotrice du promoteur distal du gène *Hoxa5* et du promoteur du gène *Hoxa6* (figure 5.2, S. Tabariès et L. Jeannotte, non publié). Ceci suggère, comme cela a été rapporté pour de nombreux gènes *Hox* (Section 1.2.2.1.1.1), une action sélective du MES pour le promoteur proximal du gène *Hoxa5* dirigeant une expression restreinte à la région pv3-pv10.

L'ensemble de cette étude sur la régulation du gène *Hoxa5* démontre la complexité de la régulation des gènes *Hox*. Dans le cas du gène *Hoxa5*, la régulation fait intervenir plusieurs séquences régulatrices, certaines pouvant être partagées avec le gène *Hoxa4*. De plus, chaque séquence régulatrice étudiée individuellement présente également une grande complexité avec l'implication de plusieurs éléments internes et l'action de nombreux facteurs agissant en *trans*. Les gènes *Hox* étant essentiels au développement correct des



individus, cette complexité est rendue nécessaire pour s'assurer du contrôle spatio-temporel adéquat de l'expression des gènes *Hox*. De ce fait, l'étude de la régulation des gènes *Hox* doit se poursuivre pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans la restriction de leur expression spatio-temporelle.

### 5.3. La mutation conditionnelle du gène *Hoxa5*

La caractérisation des souris homozygotes mutantes pour la fonction *Hoxa5* menée dans le laboratoire a montré que la perte de fonction du gène *Hoxa5* résulte en des transformations du squelette axial (entre la troisième vertèbre cervicale et la deuxième vertèbre thoracique) ainsi qu'en une mortalité périnatale élevée attribuable à une dysmorphogénèse du système respiratoire (Jeannotte et al., 1993 ; Aubin et al., 1997). De même, la perte de fonction du gène *Hoxa5* cause des anomalies qui affectent le système digestif (Aubin et al., 1999), la glande thyroïde (Meunier et al., 2003), les glandes mammaires (Garin et al., 2006) et la ceinture scapulaire (Aubin et al., 1998 ; 2002b).

Dans le chapitre 4, nous avons présenté la génération d'un mutant conditionnel pour le gène *Hoxa5*. Les résultats de la caractérisation du phénotype associée aux différents variants alléliques révèle que la stratégie utilisée pour l'obtention de ces souris est efficace. En effet, aucune protéine *Hoxa5* n'est produite chez les individus mutants pour lesquels les séquences de l'exon 2 du gène contenant la boîte homéo sont supprimées (*Hoxa5*<sup>ΔΔ</sup>) par croisement des individus avec une souris exprimant la recombinaise Cre agissant dans tous les tissus embryonnaires de façon précoce lors du développement (Chapitre 4, figure 4.1). D'autre part, cette stratégie permet la génération de variants alléliques contenant ou non la cassette de sélection. L'étude de la survie de ces différents variants alléliques montre une mortalité périnatale, présentée au tableau 4.1 du chapitre 4, qui n'est associée qu'à l'allèle mutant (*Hoxa5*<sup>Δ</sup>) et à l'allèle contenant la cassette de sélection (*Hoxa5*<sup>floxneo</sup>). Cette mortalité, d'environ 50%, est comparable à celle observée pour les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> dans un environnement génétique mixte. La mortalité observée pour l'allèle *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> semble attribuable au maintien de la cassette de sélection dans la séquence intronique du gène *Hoxa5*. De fait, l'allèle *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> se comporte comme l'allèle *Hoxa5*<sup>Δ</sup>. Chez ces individus, tout comme chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, la production du transcrit fonctionnel de

1.8 kb est affectée et aucune protéine Hoxa5 n'est produite (Chapitre 2, figure 4.1). Par ailleurs, l'étude des transcrits associés aux différents variants alléliques révèle que de nouveaux transcrits sont produits à partir des allèles *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> et *Hoxa5*<sup>Δ</sup>. Toutefois, aucun des transcrits détectés n'est d'une longueur explicable par les modifications de séquences associées à ces variants alléliques. Comme le site de polyadénylation utilisé par les différents transcrits *Hoxa5* est absent chez les individus *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup>, il est raisonnable de penser que les transcrits détectés chez ces individus proviennent de l'apparition de sites d'épissages cryptiques subséquente à l'événement de recombinaison. De même, le maintien de la cassette de sélection au sein du locus du gène *Hoxa5* peut provoquer l'apparition de sites d'épissage cryptiques. Une caractérisation de ces nouveaux transcrits permettrait de confirmer cette hypothèse. Nous avons aussi montré que la mortalité périnatale associée aux allèles *Hoxa5*<sup>-</sup>, *Hoxa5*<sup>floxneo</sup>, *Hoxa5*<sup>Δ</sup> résulte d'un défaut du développement pulmonaire (Chapitre 4, figure 4.2). La pénétrance de ce phénotype est complète mais son expressivité variable expliquant que certains individus puissent survivre. De la même façon, l'étude des squelettes démontre que les individus homozygotes pour les allèles *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> et *Hoxa5*<sup>Δ</sup> présentent des transformations similaires à celles décrites chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> soit une transformation d'antériorisation de C6 en C5, de postériorisation de C7 en T1 et de T1 en T2 (Chapitre 4, tableau 4.2) ; (Jeannotte et al., 1993; Aubin et al., 1998). Par ailleurs, les individus *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> et *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> qui survivent sont fertiles. Cette étude a donc entraîné la génération de deux nouveaux allèles mutants pour le gène *Hoxa5*, les allèles *Hoxa5*<sup>floxneo</sup> et *Hoxa5*<sup>Δ</sup> qui reproduisent le mutant nul déjà existant. Ainsi, les trois allèles mutants pour la fonction du gène *Hoxa5* ont en commun d'être caractérisés par une absence de production de protéine Hoxa5 résultant d'une perte d'expression du transcrit fonctionnel de 1.8 kb. Ceci occasionne une altération du développement pulmonaire qui entraîne une mortalité périnatale.

Par ailleurs, aucune mortalité périnatale n'est associée à l'allèle conditionnel (*Hoxa5*<sup>floxed</sup>) qui se comporte comme l'allèle de type sauvage malgré la présence de sites *loxP* et d'un site *frt* (Chapitre 4, tableau 4.1). De la même façon la transcription associée au locus du gène *Hoxa5*, la production de protéine Hoxa5, le développement pulmonaire et la spécification du squelette axial sont normaux chez ces individus *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> (Chapitre 4).

Tel que décrit à la section 1.4, le maintien de la cassette de sélection peut avoir des conséquences sur l'interprétation des phénotypes. En effet, l'organisation des complexes *Hox* est hiérarchisée et la destruction d'un locus peut interférer avec le contrôle transcriptionnel des gènes environnants (Olson et al., 1996). Il n'est donc pas impossible que le phénotype observé pour les individus *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> soit une combinaison d'une interférence transcriptionnelle du gène *Hoxa5*. De plus, une compétition de l'activité des éléments régulateurs entre le promoteur du gène ciblé et le promoteur du gène de sélection ne peut être exclue. Dans le cas de l'allèle *Hoxa5*<sup>floxneo</sup>, le phénotype de mortalité périnatale est comparable à celui des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>. Chez ces derniers, seule l'expression du court transcrit est perdue le long de la colonne prévertébrale entre pv3 et pv10 (Aubin et al., 1998). Or ce domaine d'expression est spécifiquement dirigé par le MES situé en 3' du gène. Chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, une action du MES sur le promoteur de la cassette de sélection utilisée a été suggérée (Aubin et al., 1998). Comme aucun transcrit de 1.8 kb n'est produit chez les individus *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup>, il est envisageable que les phénotypes observés chez ces individus soient dus à une perturbation spécifique de l'expression du transcrit court liée à la présence de la cassette de sélection. En effet, cette cassette de sélection contrôlée par un promoteur PGK se trouve située entre le MES et le promoteur proximal. De ce fait, le MES agirait sur le promoteur de la cassette de sélection et non sur le promoteur proximal du gène *Hoxa5* entraînant une perte d'expression du gène dans la région comprise entre pv3 et pv10. Il serait donc intéressant d'étudier la production des transcrits *Hoxa5* et néomycine chez les animaux porteurs des différents variants alléliques par hybridation *in situ* pour déterminer l'expression spatio-temporelle des transcrits associés aux différents variants. Enfin, les phénotypes rapportés pour les individus *Hoxa5*<sup>floxneo/floxneo</sup> étant comparables, notamment au niveau du squelette axial, à ceux des individus *Hoxa5*<sup>Δ/Δ</sup> et *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, il semble que le maintien de la cassette de sélection n'interfère qu'avec la fonction du gène *Hoxa5* et non avec celle des gènes environnants. En effet, chez les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>, aucune altération de l'expression du gène voisin *Hoxa4* n'est observée (Aubin et al., 1998). Toutefois, une éventuelle interférence du maintien de la cassette de sélection sur l'expression des gènes voisins du gène *Hoxa5* pourrait être étudiée par hybridation *in situ* pour déterminer l'expression spatio-temporelle des transcrits associés aux gènes *Hoxa4*, *Hoxa6* et/ou *Hoxa7*.

La mutation conditionnelle est maintenant établie dans le laboratoire. La caractérisation a été entreprise dans un environnement génétique mixte par croisement des individus *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> avec une lignée de souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *SoxII* (Hayashi et al., 2002). Ainsi, cette souris exprime spécifiquement la Cre recombinase dans les tissus dérivés de l'épiblaste soit dans tous les tissus embryonnaires. Les individus obtenus sont alors directement comparables aux individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> car tous présentent une mutation du gène dès les premiers stades du développement. Les résultats ainsi obtenus, présentés au chapitre 4, reproduisent ceux rapportés pour les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup>. Cependant, nombre des phénotypes rapportés pour les individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> proviennent d'études dans un environnement génétique 129 SvEv (Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1998; Aubin et al., 2002a; Meunier et al., 2003; Garin et al., 2006). Afin d'étudier ces phénotypes de façon similaire, l'introduction des différents allèles dans un environnement 129 SvEv est en cours.

Par ailleurs, cet outil puissant va permettre l'étude temporelle des phénotypes associés à la perte de fonction du gène *Hoxa5* en croisant les souris porteuses de l'allèle *Hoxa5*<sup>floxed</sup> avec des souris exprimant la Cre de façon inductible. Par exemple, l'expression de la Cre sous le contrôle du récepteur aux oestrogènes peut être induite par injection d'anti-oestrogène comme le tamoxifen (Imai et al., 2001; Metzger et al., 2005). Ainsi, dans des souris porteuses de l'allèle *Hoxa5*<sup>floxed</sup> et de la Cre recombinase inductible, l'injection de tamoxifen à différents stades du développement permettra de mieux appréhender l'aspect temporel de la fonction développementale du gène *Hoxa5*.

L'étude des individus *Hoxa5*<sup>-/-</sup> a également révélé l'implication du gène dans de nombreux processus d'organogenèse (Aubin et al., 1997; Aubin et al., 1999; Aubin et al., 2002a; Meunier et al., 2003; Garin et al., 2006). L'étude spécifique et individuelle de ces phénotypes pourra être menée en croisant l'allèle *Hoxa5*<sup>floxed</sup> avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle de promoteurs spécifiques à ces différents organes. Toutefois, le gène *Hoxa5* est majoritairement exprimé de façon mésenchymale et il existe donc des restrictions expérimentales liées à la disponibilité de souris exprimant la Cre recombinase dans ces tissus. Certaines lignées peuvent être envisagées, telles les souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle de la protéine spécifique des fibroblastes

(*Fsp1-Cre*), qui devrait permettre la délétion du gène dans les fibroblastes du stroma interstitiel des tissus matures (Bhowmick et al., 2004). Les souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le collagène type (I)-alpha 2 permettraient la mutation spécifique du gène *Hoxa5* dans les cellules fibroblastiques de nombreux organes et notamment au niveau du parenchyme pulmonaire et du mésenchyme intestinal (Florin et al., 2004). Enfin, il serait également intéressant d'étudier spécifiquement le phénotype stomacal en croisant les individus *Hoxa5*<sup>floxed/floxed</sup> avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle des régions promotrices du gène *Nkx3-2 (Bapx1)* qui agit au niveau du mésenchyme gastrique (Takamoto et al., 2005).

De façon indépendante, il serait possible de s'affranchir de la restriction liée à la disponibilité des souris exprimant la Cre recombinase de façon adéquate pour l'étude de la mutation du gène en tirant partie des travaux sur la régulation du gène *Hoxa5* menés dans le laboratoire. Il est ainsi envisageable de générer des souris exprimant spécifiquement la Cre sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *Hoxa5*. Ainsi, une fois clairement définis, les éléments spécifiques à l'expression du gène *Hoxa5* dans le poumon et/ou l'intestin permettraient de muter spécifiquement le gène dans les tissus de ces organes où le gène est normalement exprimé.

## 5.4. Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de révéler l'importance de plusieurs séquences incluses dans la région MES impliquées dans la restriction postérieure de l'expression du gène *Hoxa5*. Ces mêmes travaux ont amené à de nombreuses observations qui démontrent la complexité du MES qui, en plus d'être responsable de la définition du domaine fonctionnel du gène *Hoxa5*, contient de nombreuses séquences participant dans l'expression spécifique du gène dans différentes structures de l'organisme lors du développement embryonnaire. Il appert donc que le MES est loin d'avoir livré tous ses secrets et beaucoup reste encore à découvrir à son sujet. L'ensemble des résultats obtenus sur le MES ont permis l'établissement d'un modèle présomptif d'action du MES

pour restreindre l'expression du gène *Hoxa5* à la région pv3-pv10 qui est présenté à la figure 3.7 du chapitre 3.

D'autre part, la génération du mutant conditionnel du gène *Hoxa5* offre un nouvel outil pour l'étude de la fonction du gène qui devrait s'avérer très utile pour le laboratoire dans les années à venir. Il pourra, je l'espère, aider à l'identification des gènes cibles du gène *Hoxa5* ainsi que les cascades de signalisation au sein desquelles il est impliqué. Ces données permettront alors d'améliorer la compréhension de la fonction d'un gène aussi important que l'est le gène *Hoxa5*.

Par ailleurs, outre les résultats obtenus et présentés dans cette thèse, ces années de recherche au doctorat m'ont permis de vérifier, parfois à mes dépens, le proverbe chinois suivant qui, bien qu'énoncé il y a quelques siècles, s'avère toujours fondé :

J'ENTENDS ET J'OUBLIE

JE VOIS ET JE RETIENS

JE FAIS ET JE COMPRENDS

**Philosophe chinois**

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, M. A., Joksimovic, M. and Tuggle, C. K.** (2005). Ectopic HOXA5 expression results in abnormal differentiation, migration and p53-independent cell death of superficial dorsal horn neurons. *Brain Res Dev Brain Res* **159**, 87-97.
- Abu-Abed, S., Dollé, P., Metzger, D., Wood, C., MacLean, G., Chambon, P. and Petkovich, M.** (2003). Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* **130**, 1449-59.
- Affolter, M., Percival-Smith, A., Muller, M., Leupin, W. and Gehring, W. J.** (1990). DNA binding properties of the purified Antennapedia homeodomain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 4093-7.
- Akam, M.** (1987). The molecular basis for metameric pattern in the Drosophila embryo. *Development*. **101**, 1-22.
- Akasaka, T., van Lohuizen, M., van der, L. N., Mizutani-Koseki, Y., Kanno, M., Taniguchi, M., Vidal, M., Alkema, M., Berns, A. and Koseki, H.** (2001). Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes Mel18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. *Development*. **128**, 1587-1597.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G. and Humphries, R. K.** (2001). HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. *Exp Hematol* **29**, 1125-34.
- Argao, E. A., Kern, M. J., Branford, W. W., Scott, W. J., Jr. and Potter, S. S.** (1995). Malformations of the heart, kidney, palate, and skeleton in alpha-MHC-Hoxb-7 transgenic mice. *Mech Dev* **52**, 291-303.
- Aubin, J., Chailier, P., Ménard, D. and Jeannotte, L.** (1999). Loss of Hoxa5 gene function in mice perturbs intestinal maturation. *Am J Physiol*. **277**, C965-73.



**Aubin, J., Davy, A. and Soriano, P.** (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* **18**, 1482-94.

**Aubin, J., Déry, U., Lemieux, M., Chailier, P. and Jeannotte, L.** (2002a). Stomach regional specification requires Hoxa5-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development*. **129**, 4075-87.

**Aubin, J. and Jeannotte, L.** (2001). Implication des gènes Hox dans les processus d'organogenèse chez les mammifères. *médecine/Sciences* **17**, 54-62.

**Aubin, J., Lemieux, M., Moreau, J., Lapointe, J. and Jeannotte, L.** (2002b). Cooperation of Hoxa5 and Pax1 genes during formation of the pectoral girdle. *Dev Biol*. **244**, 96-113.

**Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Behringer, R. R. and Jeannotte, L.** (1998). Transcriptional interferences at the Hoxa4/Hoxa5 locus: importance of correct Hoxa5 expression for the proper specification of the axial skeleton. *Dev Dyn*. **212**, 141-56.

**Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Bérard, J. and Jeannotte, L.** (1997). Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol*. **192**, 432-45.

**Ayoubi, T. A. and Van De Ven, W. J.** (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb J* **10**, 453-60.

**Bachiller, D., Macias, A., Duboule, D. and Morata, G.** (1994). Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. *Embo J* **13**, 1930-41.

**Barrow, J. R. and Capecchi, M. R.** (1996). Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development* **122**, 3817-28.

**Barrow, J. R., Stadler, H. S. and Capecchi, M. R.** (2000). Roles of Hoxa1 and Hoxa2 in patterning the early hindbrain of the mouse. *Development* **127**, 933-44.

- Beachy, P. A., Helfand, S. L. and Hogness, D. S.** (1985). Segmental distribution of bithorax complex proteins during *Drosophila* development. *Nature* **313**, 545-51.
- Beck, F., Erler, T., Russell, A. and James, R.** (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* **204**, 219-27.
- Behringer, R. R., Crotty, D. A., Tennyson, V. M., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. and Wolgemuth, D. J.** (1993). Sequences 5' of the homeobox of the Hox-1.4 gene direct tissue-specific expression of lacZ during mouse development. *Development* **117**, 823-33.
- Bel-Vialar, S., Core, N., Terranova, R., Goudot, V., Boned, A. and Djabali, M.** (2000). Altered retinoic acid sensitivity and temporal expression of Hox genes in polycomb-M33-deficient mice. *Dev Biol* **224**, 238-49.
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N. and Krumlauf, R.** (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* **129**, 5103-15.
- Béland, M. and Lohnes, D.** (2005). Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor members repress retinoic acid-induced Cdx1 expression. *J Biol Chem* **280**, 13858-62.
- Béland, M., Pilon, N., Houle, M., Oh, K., Sylvestre, J. R., Prinos, P. and Lohnes, D.** (2004). Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol Cell Biol* **24**, 5028-38.
- Bélanger, L. F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A. M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R. and Charron, J.** (2003). Mek2 is dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* **23**, 4778-87.
- Bell, E., Wingate, R. J. and Lumsden, A.** (1999). Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science* **284**, 2168-71.

- Benson, G. V., Lim, H., Paria, B. C., Satokata, I., Dey, S. K. and Maas, R. L.** (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* **122**, 2687-96.
- Benson, G. V., Nguyen, T. H. and Maas, R. L.** (1995). The expression pattern of the murine Hoxa-10 gene and the sequence recognition of its homeodomain reveal specific properties of Abdominal B-like genes. *Mol Cell Biol* **15**, 1591-601.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F. and Blasi, F.** (1998). The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *Embo J* **17**, 1434-45.
- Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., Moses, H.L.** (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* **303**, 848-51.
- Bienz, M.** (1994). Homeotic genes and positional signalling in the Drosophila viscera. *Trends Genet* **10**, 22-6.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. and Noll, M.** (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila. *Cell* **47**, 1033-40.
- Borrow, J., Shearman, A. M., Stanton, V. P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A. J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y. L., Morris, C. et al.** (1996). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* **12**, 159-67.
- Boulet, A. M. and Capecchi, M. R.** (1996). Targeted disruption of hoxc-4 causes esophageal defects and vertebral transformations. *Dev Biol* **177**, 232-49.
- Bradshaw, M. S., Shashikant, C. S., Belting, H. G., Bollekens, J. A. and Ruddle, F. H.** (1996). A long-range regulatory element of Hoxc8 identified by using the pClasper vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2426-30.

- Brend, T., Gilthorpe, J., Summerbell, D. and Rigby, P. W.** (2003). Multiple levels of transcriptional and post-transcriptional regulation are required to define the domain of Hoxb4 expression. *Development* **130**, 2717-28.
- Burglin, T. R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res* **25**, 4173-80.
- Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A. and Tabin, C.** (1995). Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**, 333-46.
- Buske, C. and Humphries, R. K.** (2000). Homeobox genes in leukemogenesis. *Int J Hematol* **71**, 301-8.
- Cao, R., Tsukada, Y. and Zhang, Y.** (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* **20**, 845-54.
- Capovilla, M. and Botas, J.** (1998). Functional dominance among Hox genes: repression dominates activation in the regulation of Dpp. *Development* **125**, 4949-57.
- Carapuco, M., Novoa, A., Bobola, N. and Mallo, M.** (2005). Hox genes specify vertebral types in the presomitic mesoderm. *Genes Dev* **19**, 2116-21.
- Cardoso, W. V.** (1995). Transcription factors and pattern formation in the developing lung. *Am J Physiol* **269**, L429-42.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C. et al.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-9.
- Carpenter, E. M.** (2002). Hox genes and spinal cord development. *Dev Neurosci* **24**, 24-34.

**Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Chisaka, O., Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1993). Loss of Hox-A1 (Hox-1.6) function results in the reorganization of the murine hindbrain. *Development* **118**, 1063-75.

**Carpenter, E. M., Goddard, J. M., Davis, A. P., Nguyen, T. P. and Capecchi, M. R.** (1997). Targeted disruption of Hoxd-10 affects mouse hindlimb development. *Development* **124**, 4505-14.

**Carroll, S. B., Laymon, R. A., McCutcheon, M. A., Riley, P. D. and Scott, M. P.** (1986). The localization and regulation of Antennapedia protein expression in Drosophila embryos. *Cell*. **47**, 113-22.

**Casanova, J., Sanchez-Herrero, E., Busturia, A. and Morata, G.** (1987). Double and triple mutant combinations of bithorax complex of Drosophila. *Embo J.* **6**, 3103-9.

**Casanova, J., Sanchez-Herrero, E. and Morata, G.** (1985). Prothoracic transformation and functional structure of the Ultrabithorax gene of Drosophila. *Cell*. **42**, 663-9.

**Casares, F. and Mann, R. S.** (1998). Control of antennal versus leg development in Drosophila. *Nature*. **392**, 723-6.

**Casares, F. and Sanchez-Herrero, E.** (1995). Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of Drosophila by gap genes. *Development*. **121**, 1855-66.

**Castelli-Gair, J. and Akam, M.** (1995). How the Hox gene Ultrabithorax specifies two different segments: the significance of spatial and temporal regulation within metameres. *Development*. **121**, 2973-82.

**Celniker, S. E., Keelan, D. J. and Lewis, E. B.** (1989). The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev.* **3**, 1424-36.

**Chambeyron, S. and Bickmore, W. A.** (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev* **18**, 1119-30.

**Chambeyron, S., Da Silva, N. R., Lawson, K. A. and Bickmore, W. A.** (2005). Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development. *Development* **132**, 2215-23.

**Chariot, A., van Lint, C., Chapelier, M., Gielen, J., Merville, M. P. and Bours, V.** (1999). CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* **18**, 4007-14.

**Charité, J., de Graaff, W., Consten, D., Reijnen, M. J., Korving, J. and Deschamps, J.** (1998). Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* **125**, 4349-58.

**Charité, J., de Graaff, W., Shen, S. and Deschamps, J.** (1994). Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell* **78**, 589-601.

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

**Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F. and Beck, F.** (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* **386**, 84-7.

**Chen, F. and Capecchi, M. R.** (1997). Targeted mutations in hoxa-9 and hoxb-9 reveal synergistic interactions. *Dev Biol* **181**, 186-96.

**Chen, F. and Capecchi, M. R.** (1999). Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 541-6.

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

- Chisaka, O. and Capecchi, M. R.** (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* **350**, 473-9.
- Chisaka, O., Musci, T. S. and Capecchi, M. R.** (1992). Developmental defects of the ear, cranial nerves and hindbrain resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *Hox-1.6*. *Nature* **355**, 516-20.
- Chouinard, S. and Kaufman, T. C.** (1991). Control of expression of the homeotic labial (*lab*) locus of *Drosophila melanogaster*: evidence for both positive and negative autogenous regulation. *Development*. **113**, 1267-80.
- Condie, B. G. and Capecchi, M. R.** (1993). Mice homozygous for a targeted disruption of *Hoxd-3* (*Hox-4.1*) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* **119**, 579-95.
- Cribbs, D. L., Benassayag, C., Randazzo, F. M. and Kaufman, T. C.** (1995). Levels of homeotic protein function can determine developmental identity: evidence from low-level expression of the *Drosophila* homeotic gene *proboscipedia* under *Hsp70* control. *Embo J* **14**, 767-78.
- Daga, A., Podesta, M., Capra, M. C., Piaggio, G., Frassoni, F. and Corte, G.** (2000). The retroviral transduction of *HOXC4* into human *CD34(+)* cells induces an in vitro expansion of clonogenic and early progenitors. *Exp Hematol* **28**, 569-74.
- Dale, K. J. and Pourquié, O.** (2000). A clock-work somite. *Bioessays* **22**, 72-83.
- Davenne, M., Maconochie, M. K., Neun, R., Pattyn, A., Chambon, P., Krumlauf, R. and Rijli, F. M.** (1999). *Hoxa2* and *Hoxb2* control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron* **22**, 677-91.
- Davis, A. P. and Capecchi, M. R.** (1994). Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development* **120**, 2187-98.



- Davis, A. P. and Capecchi, M. R.** (1996). A mutational analysis of the 5' HoxD genes: dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development* **122**, 1175-85.
- Davis, A. P., Witte, D. P., Hsieh-Li, H. M., Potter, S. S. and Capecchi, M. R.** (1995). Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* **375**, 791-5.
- Delaune, E., Lemaire, P. and Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* **132**, 299-310.
- Delfino-Machín, M., Lunn, J. S., Breitkreuz, D. N., Akai, J. and Storey, K. G.** (2005). Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* **132**, 4273-83.
- Deschamps, J. and van Nes, J.** (2005). Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development*. **132**, 2931-42.
- Deschamps, J. and Wijgerde, M.** (1993). Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev Biol* **156**, 473-80.
- Desplan, C., Theis, J. and O'Farrell, P. H.** (1985). The *Drosophila* developmental gene, engrailed, encodes a sequence-specific DNA binding activity. *Nature*. **318**, 630-5.
- Di Rocco, G., Gavalas, A., Pöpperl, H., Krumlauf, R., Mavilio, F. and Zappavigna, V.** (2001). The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *J Biol Chem* **276**, 20506-15.
- Diez del Corral, R. and Storey, K. G.** (2004). Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* **26**, 857-69.
- DiMartino, J. F., Selleri, L., Traver, D., Firpo, M. T., Rhee, J., Warnke, R., O'Gorman, S., Weissman, I. L. and Cleary, M. L.** (2001). The Hox cofactor and proto-oncogene Pbx1 is required for maintenance of definitive hematopoiesis in the fetal liver. *Blood* **98**, 618-26.

**Dintilhac, A., Bihan, R., Guerrier, D., Deschamps, S. and Pellerin, I.** (2004). A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **4**, 215-22.

**Dollé, P., Dierich, A., LeMeur, M., Schimmang, T., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Duboule, D.** (1993a). Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* **75**, 431-41.

**Dollé, P., Lufkin, T., Krumlauf, R., Mark, M., Duboule, D. and Chambon, P.** (1993b). Local alterations of Krox-20 and Hox gene expression in the hindbrain suggest lack of rhombomeres 4 and 5 in homozygote null Hoxa-1 (Hox-1.6) mutant embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7666-70.

**Dony, C. and Gruss, P.** (1987). Specific expression of the Hox 1.3 homeo box gene in murine embryonic structures originating from or induced by the mesoderm. *Embo J* **6**, 2965-75.

**Dryer, R. L. and Covey, L. R.** (2006). Use of chromatin immunoprecipitation (ChIP) to detect transcription factor binding to highly homologous promoters in chromatin isolated from unstimulated and activated primary human B cells. *Biol Proced Online* **8**, 44-54.

**Du, H. and Taylor, H. S.** (2004). Molecular regulation of mullerian development by Hox genes. *Ann N Y Acad Sci* **1034**, 152-65.

**Duboule, D.** (1991). Patterning in the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 211-6.

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

**Duboule, D. and Morata, G.** (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* **10**, 358-64.

**Dubrulle, J., McGrew, M. J. and Pourquié, O.** (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* **106**, 219-32.

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

**Epstein, M., Pillemer, G., Yelin, R., Yisraeli, J. K. and Fainsod, A.** (1997). Patterning of the embryo along the anterior-posterior axis: the role of the caudal genes. *Development* **124**, 3805-14.

**Eun Kwon, H. and Taylor, H. S.** (2004). The role of HOX genes in human implantation. *Ann N Y Acad Sci* **1034**, 1-18.

**Farley, F. W., Soriano, P., Steffen, L. S. and Dymecki, S. M.** (2000). Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* **28**, 106-10.

**Favier, B., Le Meur, M., Chambon, P. and Dollé, P.** (1995). Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in Hoxd-11 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 310-4.

**Favier, B., Rijli, F. M., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P. and Dollé, P.** (1996). Functional cooperation between the non-paralogous genes Hoxa-10 and Hoxd-11 in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* **122**, 449-60.

**Fernandes, J., Celniker, S. E., Lewis, E. B. and VijayRaghavan, K.** (1994). Muscle development in the four-winged *Drosophila* and the role of the Ultrabithorax gene. *Curr Biol* **4**, 957-64.

**Ferretti, E., Cambronero, F., Tumpel, S., Longobardi, E., Wiedemann, L. M., Blasi, F. and Krumlauf, R.** (2005). Hoxb1 enhancer and control of rhombomere 4 expression: complex interplay between PREP1-PBX1-HOXB1 binding sites. *Mol Cell Biol* **25**, 8541-52.

**Ferretti, E., Marshall, H., Pöpperl, H., Maconochie, M., Krumlauf, R. and Blasi, F.** (2000). Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* **127**, 155-66.

**Florin, L., Alter, H., Grone, H. J., Szabowski, A., Schutz, G. and Angel, P.** (2004). Cre recombinase-mediated gene targeting of mesenchymal cells. *Genesis* **38**, 139-44.

**Folberg, A., Kovacs, E. N. and Featherstone, M. S.** (1997). Characterization and retinoic acid responsiveness of the murine Hoxd4 transcription unit. *J Biol Chem* **272**, 29151-7.

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

**Frasch, M., Chen, X. and Lufkin, T.** (1995). Evolutionary-conserved enhancers direct region-specific expression of the murine Hoxa-1 and Hoxa-2 loci in both mice and *Drosophila*. *Development* **121**, 957-74.

**Freund, J. N., Domon-Dell, C., Kedinger, M. and Duluc, I.** (1998). The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* **76**, 957-69.

**Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S. P., Halamek, L. P. and Barsh, G. S.** (1993). Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, kreisler (kr). *Development* **117**, 925-36.

**Fromental-Ramain, C., Warot, X., Lakkaraju, S., Favier, B., Haack, H., Birling, C., Dierich, A., Dollé, P. and Chambon, P.** (1996a). Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* **122**, 461-72.

**Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dollé, P. and Chambon, P.** (1996b). Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* **122**, 2997-3011.

**Fujimoto, S., Araki, K., Chisaka, O., Araki, M., Takagi, K. and Yamamura, K.** (1998). Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. *Gene* **209**, 77-85.

- Gabrielsen, O. S. and Huet, J.** (1993). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods Enzymol* **218**, 508-25.
- Galliot, B., Dollé, P., Vigneron, M., Featherstone, M. S., Baron, A. and Duboule, D.** (1989). The mouse Hox-1.4 gene: primary structure, evidence for promoter activity and expression during development. *Development* **107**, 343-59.
- Gamer, L. W. and Wright, C. V.** (1993). Murine Cdx-4 bears striking similarities to the Drosophila caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* **43**, 71-81.
- Garcia-Fernandez, J.** (2005). The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet.* **6**, 881-92.
- Garcia-Gasca, A. and Spyropoulos, D. D.** (2000). Differential mammary morphogenesis along the anteroposterior axis in Hoxc6 gene targeted mice. *Dev Dyn* **219**, 261-76.
- Garin, E., Lemieux, M., Coulombe, Y., Robinson, G. W. and Jeannotte, L.** (2006). Stromal *Hoxa5* function controls the growth and differentiation of mammary alveolar epithelium. *Dev Dyn* **235**, 1858-71.
- Gaufo, G. O., Flodby, P. and Capecchi, M. R.** (2000). Hoxb1 controls effectors of sonic hedgehog and Mash1 signaling pathways. *Development* **127**, 5343-54.
- Gaufo, G. O., Thomas, K. R. and Capecchi, M. R.** (2003). Hox3 genes coordinate mechanisms of genetic suppression and activation in the generation of branchial and somatic motoneurons. *Development* **130**, 5191-201.
- Gaunt, S. J.** (2000). Evolutionary shifts of vertebrate structures and Hox expression up and down the axial series of segments: a consideration of possible mechanisms. *Int J Dev Biol* **44**, 109-17.
- Gaunt, S. J., Cockley, A. and Drage, D.** (2004). Additional enhancer copies, with intact cdx binding sites, anteriorize Hoxa-7/lacZ expression in mouse embryos: evidence in keeping with an instructional cdx gradient. *Int J Dev Biol* **48**, 613-22.

- Gaunt, S. J., Coletta, P. L., Pravtcheva, D. and Sharpe, P. T.** (1990). Mouse Hox-3.4: homeobox sequence and embryonic expression patterns compared with other members of the Hox gene network. *Development* **109**, 329-39.
- Gavalas, A., Davenne, M., Lumsden, A., Chambon, P. and Rijli, F. M.** (1997). Role of Hoxa-2 in axon pathfinding and rostral hindbrain patterning. *Development* **124**, 3693-702.
- Gavalas, A. and Krumlauf, R.** (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 380-6.
- Gavalas, A., Studer, M., Lumsden, A., Rijli, F. M., Krumlauf, R. and Chambon, P.** (1998). Hoxa1 and Hoxb1 synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* **125**, 1123-36.
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M. and Gridley, T.** (1993). Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* **75**, 1317-31.
- Gérard, M., Chen, J. Y., Gronemeyer, H., Chambon, P., Duboule, D. and Zákány, J.** (1996). In vivo targeted mutagenesis of a regulatory element required for positioning the Hoxd-11 and Hoxd-10 expression boundaries. *Genes Dev* **10**, 2326-34.
- Glicksman, M. A. and Brower, D. L.** (1988). Misregulation of homeotic gene expression in *Drosophila* larvae resulting from mutations at the extra sex combs locus. *Dev Biol.* **126**, 219-27.
- Goddard, J. M., Rossel, M., Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1996). Mice with targeted disruption of Hoxb-1 fail to form the motor nucleus of the VIIth nerve. *Development* **122**, 3217-28.
- Godwin, A. R. and Capecchi, M. R.** (1998). Hoxc13 mutant mice lack external hair. *Genes Dev* **12**, 11-20.

**Gonzalez-Reyes, A. and Morata, G.** (1990). The developmental effect of overexpressing a Ubx product in *Drosophila* embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell* **61**, 515-22.

**Goodman, F. R. and Scambler, P. J.** (2001). Human HOX gene mutations. *Clin Genet* **59**, 1-11.

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

**Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R. A. and Krumlauf, R.** (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* **11**, 900-13.

**Greer, J. M. and Capecchi, M. R.** (2002). Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron* **33**, 23-34.

**Greer, J. M., Puetz, J., Thomas, K. R. and Capecchi, M. R.** (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature* **403**, 661-5.

**Gutman, A., Gilthorpe, J. and Rigby, P. W.** (1994). Multiple positive and negative regulatory elements in the promoter of the mouse homeobox gene Hoxb-4. *Mol Cell Biol* **14**, 8143-54.

**Haerry, T. E. and Gehring, W. J.** (1996). Intron of the mouse Hoxa-7 gene contains conserved homeodomain binding sites that can function as an enhancer element in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13884-9.

**Hafen, E., Levine, M. and Gehring, W. J.** (1984). Regulation of Antennapedia transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **307**, 287-9.

**Harding, K. and Levine, M.** (1988). Gap genes define the limits of antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *Embo J.* **7**, 205-14.



- Harding, K., Wedeen, C., McGinnis, W. and Levine, M.** (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science*. **229**, 1236-42.
- Hayashi, S., Lewis, P., Pevny, L. and McMahon, A. P.** (2002). Efficient gene modulation in mouse epiblast using a Sox2Cre transgenic mouse strain. *Mech Dev* **119 Suppl 1**, S97-S101.
- Helmbacher, F., Pujades, C., Desmarquet, C., Frain, M., Rijli, F. M., Chambon, P. and Charnay, P.** (1998). Hoxa1 and Krox-20 synergize to control the development of rhombomere 3. *Development* **125**, 4739-48.
- Hérault, Y., Fraudeau, N., Zákány, J. and Duboule, D.** (1997). Ulnaless (UI), a regulatory mutation inducing both loss-of-function and gain-of-function of posterior Hoxd genes. *Development* **124**, 3493-500.
- Hisa, T., Spence, S. E., Rachel, R. A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J. M., Devor-Henneman, D. E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L. et al.** (2004). Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *Embo J* **23**, 450-9.
- Hoegg, S. and Meyer, A.** (2005). Hox clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet.* **21**, 421-4.
- Hoey, T. and Levine, M.** (1988). Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature*. **332**, 858-61.
- Hogan, B. L., Holland, P. W. and Lumsden, A.** (1988). Expression of the homeobox gene, Hox 2.1, during mouse embryogenesis. *Cell Differ Dev* **25 Suppl**, 39-44.
- Hogan, B. M., Beddington, R. S., Costantini, F. and Lacy, E.** (1994). Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press* **2nd edition**.
- Holland, P. W. and Takahashi, T.** (2005). The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development. *Brain Res Bull.* **66**, 484-90.

- Hombria, J. C. and Lovegrove, B.** (2003). Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* **71**, 461-76.
- Horan, G. S., Kovacs, E. N., Behringer, R. R. and Featherstone, M. S.** (1995a). Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev Biol* **169**, 359-72.
- Horan, G. S., Ramírez-Solis, R., Featherstone, M. S., Wolgemuth, D. J., Bradley, A. and Behringer, R. R.** (1995b). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev* **9**, 1667-77.
- Horan, G. S., Wu, K., Wolgemuth, D. J. and Behringer, R. R.** (1994). Homeotic transformation of cervical vertebrae in *Hoxa-4* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12644-8.
- Horn, J. M. and Ashworth, A.** (1995). A member of the caudal family of homeobox genes maps to the X-inactivation centre region of the mouse and human X chromosomes. *Hum Mol Genet* **4**, 1041-7.
- Houle, M., Prinos, P., Iulianella, A., Bouchard, N. and Lohnes, D.** (2000). Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol Cell Biol* **20**, 6579-86.
- Houle, M., Sylvestre, J. R. and Lohnes, D.** (2003). Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo. *Development* **130**, 6555-67.
- Hsieh-Li, H. M., Witte, D. P., Weinstein, M., Branford, W., Li, H., Small, K. and Potter, S. S.** (1995). *Hoxa 11* structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* **121**, 1373-85.
- Huang, D., Chen, S. W., Langston, A. W. and Gudas, L. J.** (1998). A conserved retinoic acid responsive element in the murine *Hoxb-1* gene is required for expression in the developing gut. *Development* **125**, 3235-46.

**Hunter, C. P., Harris, J. M., Maloof, J. N. and Kenyon, C.** (1999). Hox gene expression in a single *Caenorhabditis elegans* cell is regulated by a caudal homolog and intercellular signals that inhibit wnt signaling. *Development* **126**, 805-14.

**Iimura, T. and Pourquié, O.** (2006). Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression. *Nature* **442**, 568-71.

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

**Imai, T., Jiang, M., Chambon, P. and Metzger, D.** (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 224-8.

**Irving, C. and Mason, I.** (2000). Signalling by FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of Hox gene expression. *Development* **127**, 177-86.

**Isaacs, H. V., Pownall, M. E. and Slack, J. M.** (1998). Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue Xcad3. *Embo J* **17**, 3413-27.

**Izpisúa-Belmonte, J. C., Dollé, P., Renucci, A., Zappavigna, V., Falkenstein, H. and Duboule, D.** (1990). Primary structure and embryonic expression pattern of the mouse Hox-4.3 homeobox gene. *Development* **110**, 733-45.

**Izpisúa-Belmonte, J. C., Falkenstein, H., Dollé, P., Renucci, A. and Duboule, D.** (1991). Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *Embo J* **10**, 2279-89.

**Jäckle, H. D., Tautz, D., Schuh, E., Seifert, E. and Lehmann, R.** (1986). Cross-regulatory interactions among gap genes of *Drosophila*. *Nature* **324**, 668-670.

- Jacks, T., Shih, T. S., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Bernards, A. and Weinberg, R. A.** (1994). Tumour predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *Nfl*. *Nat Genet* **7**, 353-61.
- Jeannotte, L., Lemieux, M., Charron, J., Poirier, F. and Robertson, E. J.** (1993). Specification of axial identity in the mouse: role of the *Hoxa-5* (*Hox1.3*) gene. *Genes Dev.* **7**, 2085-96.
- Jeannotte, L., Ruiz, J. C. and Robertson, E. J.** (1991). Low level of *Hox1.3* gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *Mol Cell Biol.* **11**, 5578-85.
- Jegalian, B. G., Miller, R. W., Wright, C. V., Blum, M. and De Robertis, E. M.** (1992). A *Hox 3.3-lacZ* transgene expressed in developing limbs. *Mech Dev* **39**, 171-80.
- Joksimovic, M., Abbott, M. A., Jeannotte, L. and Tuggle, C. K.** (en préparation). Role of murine *HOXA5* in development of the inferior olivary nucleus.
- Joksimovic, M., Jeannotte, L. and Tuggle, C. K.** (2005). Dynamic expression of murine *HOXA5* protein in the central nervous system. *Gene Expr Patterns.* **5**, 792-800.
- Jungbluth, S., Bell, E. and Lumsden, A.** (1999). Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual *Hox* genes. *Development* **126**, 2751-8.
- Kamps, M. P., Murre, C., Sun, X. H. and Baltimore, D.** (1990). A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**, 547-55.
- Kaufman, T. C., Seeger, M. A. and Olsen, G.** (1990). Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet.* **27**, 309-62.
- Kaur, S., Singh, G., Stock, J. L., Schreiner, C. M., Kier, A. B., Yager, K. L., Mucenski, M. L., Scott, W. J., Jr. and Potter, S. S.** (1992). Dominant mutation of the murine *Hox-2.2* gene results in developmental abnormalities. *J Exp Zool* **264**, 323-36.

**Kennison, J. A.** (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet.* **9**, 75-9.

**Kessel, M., Balling, R. and Gruss, P.** (1990). Variations of cervical vertebrae after expression of a Hox-1.1 transgene in mice. *Cell* **61**, 301-8.

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

**Kim, C. H., Hwang, D. Y., Park, J. J. and Kim, K. S.** (2002). A proximal promoter domain containing a homeodomain-binding core motif interacts with multiple transcription factors, including HoxA5 and Phox2 proteins, and critically regulates cell type-specific transcription of the human norepinephrine transporter gene. *J Neurosci* **22**, 2579-89.

**Kinkead, R., LeBlanc, M., Gulemetova, R., Lalancette-Hébert, M., Lemieux, M., Mandeville, I. and Jeannotte, L.** (2004). Respiratory adaptations to lung morphological defects in adult mice lacking Hoxa5 gene function. *Pediatr Res.* **56**, 553-62. Epub 2004 Aug 4.

**Kmita, M. and Duboule, D.** (2003). Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* **301**, 331-3.

**Kmita, M., Fraudeau, N., Héroult, Y. and Duboule, D.** (2002a). Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature.* **420**, 145-50.

**Kmita, M., Kondo, T. and Duboule, D.** (2000a). Targeted inversion of a polar silencer within the HoxD complex re-allocates domains of enhancer sharing. *Nat Genet.* **26**, 451-4.

**Kmita, M., Tarchini, B., Duboule, D. and Héroult, Y.** (2002b). Evolutionary conserved sequences are required for the insulation of the vertebrate Hoxd complex in neural cells. *Development* **129**, 5521-8.

- Kmita, M., Tarchini, B., Zákány, J., Logan, M., Tabin, C. J. and Duboule, D. (2005).** Early developmental arrest of mammalian limbs lacking HoxA/HoxD gene function. *Nature* **435**, 1113-6.
- Kmita, M., van Der Hoeven, F., Zákány, J., Krumlauf, R. and Duboule, D. (2000b).** Mechanisms of Hox gene colinearity: transposition of the anterior Hoxb1 gene into the posterior HoxD complex. *Genes Dev* **14**, 198-211.
- Knittel, T., Kessel, M., Kim, M. H. and Gruss, P. (1995).** A conserved enhancer of the human and murine Hoxa-7 gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* **121**, 1077-88.
- Knoepfler, P. S., Calvo, K. R., Chen, H., Antonarakis, S. E. and Kamps, M. P. (1997).** Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14553-8.
- Kobrossy, L., Rastegar, M. and Featherstone, M. (2006).** Interplay between chromatin and trans-acting factors regulating the Hoxd4 promoter during neural differentiation. *J Biol Chem*.
- Kondo, T., Dollé, P., Zákány, J. and Duboule, D. (1996).** Function of posterior HoxD genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development* **122**, 2651-9.
- Kondo, T. and Duboule, D. (1999).** Breaking colinearity in the mouse HoxD complex. *Cell* **97**, 407-17.
- Kondo, T., Héroult, Y., Zákány, J. and Duboule, D. (1998a).** Genetic control of murine limb morphogenesis: relationships with human syndromes and evolutionary relevance. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 3-8.
- Kondo, T., Zákány, J. and Duboule, D. (1998b).** Control of colinearity in AbdB genes of the mouse HoxD complex. *Mol Cell* **1**, 289-300.
- Kondo, T., Zákány, J., Innis, J. W. and Duboule, D. (1997).** Of fingers, toes and penises. *Nature* **390**, 29.

- Kostic, D. and Capecchi, M. R.** (1994). Targeted disruptions of the murine Hoxa-4 and Hoxa-6 genes result in homeotic transformations of components of the vertebral column. *Mech Dev* **46**, 231-47.
- Krieger, K. E., Abbott, M. A., Joksimovic, M., Lueth, P. A., Sonea, I. M., Jeannotte, L. and Tuggle, C. K.** (2004). Transgenic mice ectopically expressing HOXA5 in the dorsal spinal cord show structural defects of the cervical spinal cord along with sensory and motor defects of the forelimb. *Brain Res Dev Brain Res.* **150**, 125-39.
- Krumlauf, R.** (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* **78**, 191-201.
- Krumlauf, R., Holland, P. W., McVey, J. H. and Hogan, B. L.** (1987). Developmental and spatial patterns of expression of the mouse homeobox gene, Hox 2.1. *Development* **99**, 603-17.
- Kuziora, M. A. and McGinnis, W.** (1988). Autoregulation of a Drosophila homeotic selector gene. *Cell.* **55**, 477-85.
- Kwan, C. T., Tsang, S. L., Krumlauf, R. and Sham, M. H.** (2001). Regulatory analysis of the mouse Hoxb3 gene: multiple elements work in concert to direct temporal and spatial patterns of expression. *Dev Biol* **232**, 176-90.
- Lamka, M. L., Boulet, A. M. and Sakonju, S.** (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during Drosophila embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* **116**, 841-54.
- Lampe, X., Picard, J. J. and Rezsöházy, R.** (2004). The Hoxa2 enhancer 2 contains a critical Hoxa2 responsive regulatory element. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 898-902.
- Larochelle, C., Tremblay, M., Bernier, D., Aubin, J. and Jeannotte, L.** (1999). Multiple cis-acting regulatory regions are required for restricted spatio-temporal Hoxa5 gene expression. *Dev Dyn.* **214**, 127-40.



- LaRonde-LeBlanc, N. A. and Wolberger, C.** (2003). Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* **17**, 2060-72.
- Laughon, A., Boulet, A. M., Bermingham, J. R., Jr., Laymon, R. A. and Scott, M. P.** (1986). Structure of transcripts from the homeotic Antennapedia gene of *Drosophila melanogaster*: two promoters control the major protein-coding region. *Mol Cell Biol* **6**, 4676-89.
- Lawrence, H. J., Rozenfeld, S., Cruz, C., Matsukuma, K., Kwong, A., Komuves, L., Buchberg, A. M. and Largman, C.** (1999a). Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* **13**, 1993-9.
- Lawrence, P. A., Casal, J. and Struhl, G.** (1999b). hedgehog and engrailed: pattern formation and polarity in the *Drosophila* abdomen. *Development* **126**, 2431-9.
- Le Mouellic, H., Lallemand, Y. and Brulet, P.** (1992). Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene. *Cell* **69**, 251-64.
- Lerner, A., D'Adamio, L., Diener, A. C., Clayton, L. K. and Reinherz, E. L.** (1993). CD3 zeta/eta/theta locus is colinear with and transcribed antisense to the gene encoding the transcription factor Oct-1. *J Immunol* **151**, 3152-62.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. **276**, 565-70.
- Li, X. and McGinnis, W.** (1999). Activity regulation of Hox proteins, a mechanism for altering functional specificity in development and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6802-7.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B. I., Freund, J. N. and Kemler, R.** (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* **127**, 3805-13.

**Lickert, H. and Kemler, R.** (2002). Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early Cdx1 gene expression in the mouse. *Dev Dyn* **225**, 216-20.

**Lickert, H., Kispert, A., Kutsch, S. and Kemler, R.** (2001). Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mech Dev* **105**, 181-4.

**Liu, J. P., Laufer, E. and Jessell, T. M.** (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* **32**, 997-1012.

**Lohnes, D.** (2003). The Cdx1 homeodomain protein: an integrator of posterior signaling in the mouse. *Bioessays* **25**, 971-80.

**Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M. and Chambon, P.** (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643-58.

**Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dollé, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P.** (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723-48.

**Lorentz, O., Duluc, I., Arcangelis, A. D., Simon-Assmann, P., Kedinger, M. and Freund, J. N.** (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* **139**, 1553-65.

**Lufkin, T.** (1996). Transcriptional control of Hox genes in the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 575-80.

**Lufkin, T., Dierich, A., LeMeur, M., Mark, M. and Chambon, P.** (1991). Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* **66**, 1105-19.

**Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-15.

- Macdonald, P. M. and Struhl, G.** (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* **324**, 537-45.
- Mack, J. A., Abramson, S. R., Ben, Y., Coffin, J. C., Rothrock, J. K., Maytin, E. V., Hascall, V. C., Largman, C. and Stelnicki, E. J.** (2003). Hoxb13 knockout adult skin exhibits high levels of hyaluronan and enhanced wound healing. *Faseb J* **17**, 1352-4.
- Mack, J. A., Li, L., Sato, N., Hascall, V. C. and Maytin, E. V.** (2005). Hoxb13 up-regulates transglutaminase activity and drives terminal differentiation in an epidermal organotypic model. *J Biol Chem* **280**, 29904-11.
- Maconochie, M. K., Nonchev, S., Studer, M., Chan, S. K., Pöpperl, H., Sham, M. H., Mann, R. S. and Krumlauf, R.** (1997). Cross-regulation in the mouse HoxB complex: the expression of Hoxb2 in rhombomere 4 is regulated by Hoxb1. *Genes Dev* **11**, 1885-95.
- Mandeville, I., Aubin, J., LeBlanc, M., Lalancette-Hebert, M., Janelle, M. F., Tremblay, G. M. and Jeannotte, L.** (soumis). Impact of the loss of Hoxa5 function on lung alveogenesis.
- Mandeville, I., Aubin, J., LeBlanc, M., Lalancette-Hébert, M., Janelle, M. F., Tremblay, G. M. and Jeannotte, L.** (2006). Impact of the loss of Hoxa5 function on lung alveogenesis. *Am J Pathol*.
- Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1995). The role of Hoxa-3 in mouse thymus and thyroid development. *Development* **121**, 1989-2003.
- Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1997). Hox group 3 paralogous genes act synergistically in the formation of somitic and neural crest-derived structures. *Dev Biol* **192**, 274-88.
- Manley, N. R. and Capecchi, M. R.** (1998). Hox group 3 paralogs regulate the development and migration of the thymus, thyroid, and parathyroid glands. *Dev Biol* **195**, 1-15.

**Mann, R. S. and Hogness, D. S.** (1990). Functional dissection of Ultrabithorax proteins in *D. melanogaster*. *Cell* **60**, 597-610.

**Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G. et al.** (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* **36**, 1079-83.

**Manzanares, M., Bel-Vialar, S., Ariza-McNaughton, L., Ferretti, E., Marshall, H., Maconochie, M. M., Blasi, F. and Krumlauf, R.** (2001). Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms. *Development* **128**, 3595-607.

**Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G. and Krumlauf, R.** (1999a). Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous *Hoxa3* and *Hoxb3* genes. *Development* **126**, 759-69.

**Manzanares, M., Cordes, S., Kwan, C. T., Sham, M. H., Barsh, G. S. and Krumlauf, R.** (1997). Segmental regulation of *Hoxb-3* by *kreisler*. *Nature* **387**, 191-5.

**Manzanares, M., Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, P., Marshall, H., Giudicelli, F., Martinez-Pastor, M. T., Krumlauf, R. and Charnay, P.** (2002). *Krox20* and *kreisler* cooperate in the transcriptional control of segmental expression of *Hoxb3* in the developing hindbrain. *Embo J* **21**, 365-76.

**Manzanares, M., Trainor, P. A., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H., Morrison, A., Kwan, C. T., Sham, M. H. et al.** (1999b). The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. *Dev Biol* **211**, 220-37.

**Margalit, Y., Yarus, S., Shapira, E., Gruenbaum, Y. and Fainsod, A.** (1993). Isolation and characterization of target sequences of the chicken *CdxA* homeobox gene. *Nucleic Acids Res* **21**, 4915-22.

**Mark, M., Lufkin, T., Vonesch, J. L., Ruberte, E., Olivo, J. C., Dollé, P., Gorry, P., Lumsden, A. and Chambon, P.** (1993). Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development* **119**, 319-38.

**Marshall, H., Studer, M., Pöpperl, H., Aparicio, S., Kuroiwa, A., Brenner, S. and Krumlauf, R.** (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*. *Nature* **370**, 567-71.

**Martinez-Arias, A. and Lawrence, P. A.** (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature*. **313**, 639-42.

**Maves, L. and Kimmel, C. B.** (2005). Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev Biol* **285**, 593-605.

**McGinnis, W. and Krumlauf, R.** (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.

**McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. and Gehring, W. J.** (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*. **308**, 428-33.

**McIntyre, D. C., Rakshit, S., Loken, L., Jeannotte, L., capecchi, M. R. and Wellik, D. M.** (soumis). Hox patterning of the rib cage: Loss of Hox paralogous group 5, 6 and 9 results in anterior homeotic vertebral transformations and non-colinear sternal defects.

**McKay, I. J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A. and Lewis, J.** (1994). The kreisler mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* **120**, 2199-211.

**McLain, K., Schreiner, C., Yager, K. L., Stock, J. L. and Potter, S. S.** (1992). Ectopic expression of *Hox-2.3* induces craniofacial and skeletal malformations in transgenic mice. *Mech Dev* **39**, 3-16.

- McNulty, C. L., Peres, J. N., Bardine, N., van den Akker, W. M. and Durston, A. J.** (2005). Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development* **132**, 2861-71.
- Medina-Martinez, O., Bradley, A. and Ramírez-Solis, R.** (2000). A large targeted deletion of Hoxb1-Hoxb9 produces a series of single-segment anterior homeotic transformations. *Dev Biol* **222**, 71-83.
- Medina-Martinez, O. and Ramírez-Solis, R.** (2003). In vivo mutagenesis of the Hoxb8 hexapeptide domain leads to dominant homeotic transformations that mimic the loss-of-function mutations in genes of the Hoxb cluster. *Dev Biol* **264**, 77-90.
- Metzger, D., Li, M. and Chambon, P.** (2005). Targeted somatic mutagenesis in the mouse epidermis. *Methods Mol Biol* **289**, 329-40.
- Meunier, D., Aubin, J. and Jeannotte, L.** (2003). Perturbed thyroid morphology and transient hypothyroidism symptoms in Hoxa5 mutant mice. *Dev Dyn.* **227**, 367-78.
- Meyer, B. I. and Gruss, P.** (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* **117**, 191-203.
- Meyers, E. N., Lewandoski, M. and Martin, G. R.** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* **18**, 136-41.
- Mlodzik, M. and Gehring, W. J.** (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* **48**, 465-78.
- Mlodzik, M., Gibson, G. and Gehring, W. J.** (1990). Effects of ectopic expression of caudal during *Drosophila* development. *Development* **109**, 271-7.
- Moens, C. B., Cordes, S. P., Giorgianni, M. W., Barsh, G. S. and Kimmel, C. B.** (1998). Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development* **125**, 381-91.

- Moens, C. B. and Selleri, L.** (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev Biol* **291**, 193-206.
- Moens, C. B., Yan, Y. L., Appel, B., Force, A. G. and Kimmel, C. B.** (1996). valentino: a zebrafish gene required for normal hindbrain segmentation. *Development* **122**, 3981-90.
- Monica, K., Galili, N., Nourse, J., Saltman, D. and Cleary, M. L.** (1991). PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* **11**, 6149-57.
- Moreau, J. and Jeannotte, L.** (2002). Sequence analysis of a Hoxa4-Hoxa5 intergenic region including shared regulatory elements. *DNA Seq.* **13**, 203-9.
- Morgan, R.** (2006). Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet* **22**, 67-9.
- Morrison, A., Ariza-McNaughton, L., Gould, A., Featherstone, M. and Krumlauf, R.** (1997). HOXD4 and regulation of the group 4 paralog genes. *Development* **124**, 3135-46.
- Morrison, A., Moroni, M. C., Ariza-McNaughton, L., Krumlauf, R. and Mavilio, F.** (1996). In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development* **122**, 1895-907.
- Müller, U.** (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* **82**, 3-21.
- Nam, J. and Nei, M.** (2005). Evolutionary change of the numbers of homeobox genes in bilateral animals. *Mol Biol Evol.* **22**, 2386-94. Epub 2005 Aug 3.
- Neuteboom, S. T., Peltenburg, L. T., van Dijk, M. A. and Murre, C.** (1995). The hexapeptide LFPWVR in Hoxb-8 is required for cooperative DNA binding with Pbx1 and Pbx2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9166-70.



**Niederreither, K., Remboutsika, E., Gansmuller, A., Losson, R. and Dollé, P. (1999).** Expression of the transcriptional intermediary factor TIF1alpha during mouse development and in the reproductive organs. *Mech Dev* **88**, 111-7.

**Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Dollé, P. (2000).** Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127**, 75-85.

**Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Maruthainar, K., Kuroiwa, A., Brenner, S., Charnay, P. et al. (1996a).** The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9339-45.

**Nonchev, S., Vesque, C., Maconochie, M., Seitanidou, T., Ariza-McNaughton, L., Frain, M., Marshall, H., Sham, M. H., Krumlauf, R. and Charnay, P. (1996b).** Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development* **122**, 543-54.

**Nourse, J., Mellentin, J. D., Galili, N., Wilkinson, J., Stanbridge, E., Smith, S. D. and Cleary, M. L. (1990).** Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**, 535-45.

**Nowicki, J. L. and Burke, A. C. (2000).** Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* **127**, 4265-75.

**Nowling, T., Zhou, W., Krieger, K. E., Larochelle, C., Nguyen-Huu, M. C., Jeannotte, L. and Tuggle, C. K. (1999).** Hoxa5 gene regulation: A gradient of binding activity to a brachial spinal cord element. *Dev Biol.* **208**, 134-46.

**Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980).** Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* **287**, 795-801.

**Odenwald, W. F., Garbern, J., Arnheiter, H., Tournier-Lasserre, E. and Lazzarini, R. A.** (1989). The Hox-1.3 homeo box protein is a sequence-specific DNA-binding phosphoprotein. *Genes Dev* **3**, 158-72.

**Odenwald, W. F., Taylor, C. F., Palmer-Hill, F. J., Friedrich, V., Jr., Tani, M. and Lazzarini, R. A.** (1987). Expression of a homeo domain protein in noncontact-inhibited cultured cells and postmitotic neurons. *Genes Dev* **1**, 482-96.

**Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W. and Wold, B. J.** (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85**, 1-4.

**Oosterveen, T., Meijlink, F. and Deschamps, J.** (2004). Expression of retinaldehyde dehydrogenase II and sequential activation of 5' Hoxb genes in the mouse caudal hindbrain. *Gene Expr Patterns* **4**, 243-7.

**Oosterveen, T., Niederreither, K., Dollé, P., Chambon, P., Meijlink, F. and Deschamps, J.** (2003a). Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' Hoxb genes in posterior hindbrain. *Embo J.* **22**, 262-9.

**Oosterveen, T., van Vliet, P., Deschamps, J. and Meijlink, F.** (2003b). The direct context of a hox retinoic acid response element is crucial for its activity. *J Biol Chem* **278**, 24103-7.

**Packer, A. I., Crotty, D. A., Elwell, V. A. and Wolgemuth, D. J.** (1998). Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* **125**, 1991-8.

**Panganiban, G. E., Reuter, R., Scott, M. P. and Hoffmann, F. M.** (1990). A Drosophila growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development* **110**, 1041-50.

**Papenbrock, T., Peterson, R. L., Lee, R. S., Hsu, T., Kuroiwa, A. and Awgulewitsch, A.** (1998). Murine Hoxc-9 gene contains a structurally and functionally conserved enhancer. *Dev Dyn* **212**, 540-7.

- Partanen, J., Schwartz, L. and Rossant, J.** (1998). Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev* **12**, 2332-44.
- Pasquinelli, A. E., Hunter, S. and Bracht, J.** (2005). MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 200-5.
- Pattatucci, A. M., Otteson, D. C. and Kaufman, T. C.** (1991). A functional and structural analysis of the Sex combs reduced locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **129**, 423-41.
- Patterson, L. T., Pembaur, M. and Potter, S. S.** (2001). Hoxa11 and Hoxd11 regulate branching morphogenesis of the ureteric bud in the developing kidney. *Development* **128**, 2153-61.
- Pazdera, T. M., Janardhan, P. and Minden, J. S.** (1998). Patterned epidermal cell death in wild-type and segment polarity mutant *Drosophila* embryos. *Development* **125**, 3427-36.
- Pazin, M. J. and Kadonaga, J. T.** (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell*. **88**, 737-40.
- Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W.** (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet*. **6**, 893-904.
- Pederson, J. D., Kiehart, D. P. and Mahaffey, J. W.** (1996). The role of HOM-C genes in segmental transformations: reexamination of the *Drosophila* Sex combs reduced embryonic phenotype. *Dev Biol*. **180**, 131-42.
- Peichel, C. L., Prabhakaran, B. and Vogt, T. F.** (1997). The mouse *Ulnaless* mutation deregulates posterior HoxD gene expression and alters appendicular patterning. *Development* **124**, 3481-92.
- Peifer, M., Karch, F. and Bender, W.** (1987). The Bithorax complex: control of segment identity. *Genes Dev* **1**, 891-898.

- Peterson, C. L. and Tamkun, J. W.** (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci.* **20**, 143-6.
- Pham, C. T., MacIvor, D. M., Hug, B. A., Heusel, J. W. and Ley, T. J.** (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13090-5.
- Pilon, N., Oh, K., Sylvestre, J. R., Bouchard, N., Savory, J. and Lohnes, D.** (2006). Cdx4 is a direct target of the canonical Wnt pathway. *Dev Biol* **289**, 55-63.
- Plaza, S., Prince, F., Jaeger, J., Kloter, U., Flister, S., Benassayag, C., Cribbs, D. and Gehring, W. J.** (2001). Molecular basis for the inhibition of Drosophila eye development by Antennapedia. *Embo J.* **20**, 802-11.
- Podlasek, C. A., Duboule, D. and Bushman, W.** (1997). Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. *Dev Dyn* **208**, 454-65.
- Pollock, R. A., Sreenath, T., Ngo, L. and Bieberich, C. J.** (1995). Gain of function mutations for paralogous Hox genes: implications for the evolution of Hox gene function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4492-6.
- Pöpperl, H., Bienz, M., Studer, M., Chan, S. K., Aparicio, S., Brenner, S., Mann, R. S. and Krumlauf, R.** (1995). Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* **81**, 1031-42.
- Potter, S. S. and Branford, W. W.** (1998). Evolutionary conservation and tissue-specific processing of Hoxa 11 antisense transcripts. *Mamm Genome* **9**, 799-806.
- Pownall, M. E., Isaacs, H. V. and Slack, J. M.** (1998). Two phases of Hox gene regulation during early Xenopus development. *Curr Biol* **8**, 673-6.
- Pownall, M. E., Tucker, A. S., Slack, J. M. and Isaacs, H. V.** (1996). eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in Xenopus. *Development* **122**, 3881-92.

**Prinos, P., Joseph, S., Oh, K., Meyer, B. I., Gruss, P. and Lohnes, D.** (2001). Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev Biol* **239**, 257-69.

**Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M.** (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-58.

**Raman, V., Martensen, S. A., Reisman, D., Evron, E., Odenwald, W. F., Jaffee, E., Marks, J. and Sukumar, S.** (2000a). Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature* **405**, 974-8.

**Raman, V., Tamori, A., Vali, M., Zeller, K., Korz, D. and Sukumar, S.** (2000b). HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. *J Biol Chem* **275**, 26551-5.

**Ramírez-Solis, R., Zheng, H., Whiting, J., Krumlauf, R. and Bradley, A.** (1993). Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* **73**, 279-94.

**Rancourt, D. E., Tsuzuki, T. and Capecchi, M. R.** (1995). Genetic interaction between hoxb-5 and hoxb-6 is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev* **9**, 108-22.

**Rastegar, M., Kobrossy, L., Kovacs, E. N., Rambaldi, I. and Featherstone, M.** (2004). Sequential histone modifications at Hoxd4 regulatory regions distinguish anterior from posterior embryonic compartments. *Mol Cell Biol* **24**, 8090-103.

**Remacle, S., Abbas, L., De Backer, O., Pacico, N., Gavalas, A., Gofflot, F., Picard, J. J. and Rezsöházy, R.** (2004). Loss of function but no gain of function caused by amino acid substitutions in the hexapeptide of Hoxa1 in vivo. *Mol Cell Biol* **24**, 8567-75.

**Ren, S. Y., Angrand, P. O. and Rijli, F. M.** (2002). Targeted insertion results in a rhombomere 2-specific Hoxa2 knockdown and ectopic activation of Hoxa1 expression. *Dev Dyn* **225**, 305-15.

**Reuter, R., Panganiban, G. E., Hoffmann, F. M. and Scott, M. P.** (1990). Homeotic genes regulate the spatial expression of putative growth factors in the visceral mesoderm of *Drosophila* embryos. *Development* **110**, 1031-40.

**Reuter, R. and Scott, M. P.** (1990). Expression and function of the homoeotic genes Antennapedia and Sex combs reduced in the embryonic midgut of *Drosophila*. *Development*. **109**, 289-303.

**Rijli, F. M. and Chambon, P.** (1997). Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 481-7.

**Rijli, F. M., Dollé, P., Fraulob, V., LeMeur, M. and Chambon, P.** (1994). Insertion of a targeting construct in a Hoxd-10 allele can influence the control of Hoxd-9 expression. *Dev Dyn* **201**, 366-77.

**Rijli, F. M., Mark, M., Lakkaraju, S., Dierich, A., Dollé, P. and Chambon, P.** (1993). A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* **75**, 1333-49.

**Rijli, F. M., Matyas, R., Pellegrini, M., Dierich, A., Gruss, P., Dollé, P. and Chambon, P.** (1995). Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in Hoxa-10 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8185-9.

**Riley, P. D., Carroll, S. B. and Scott, M. P.** (1987). The expression and regulation of Sex combs reduced protein in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **1**, 716-30.

**Roelen, B. A., de Graaff, W., Forlani, S. and Deschamps, J.** (2002). Hox cluster polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of clustered Hox genes in the mouse. *Mech Dev* **119**, 81-90.

**Rossel, M. and Capecchi, M. R.** (1999). Mice mutant for both Hoxa1 and Hoxb1 show extensive remodeling of the hindbrain and defects in craniofacial development. *Development* **126**, 5027-40.

- Ruddle, F. H., Bentley, K. L., Murtha, M. T. and Risch, N.** (1994). Gene loss and gain in the evolution of the vertebrates. *Dev Suppl*, 155-61.
- Saegusa, H., Takahashi, N., Noguchi, S. and Suemori, H.** (1996). Targeted disruption in the mouse *Hoxc-4* locus results in axial skeleton homeosis and malformation of the xiphoid process. *Dev Biol* **174**, 55-64.
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J. and Hamada, H.** (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* **15**, 213-25.
- Sanchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. and Morata, G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila bithorax* complex. *Nature*. **313**, 108-13.
- Sanlioglu, S., Zhang, X., Baader, S. L. and Oberdick, J.** (1998). Regulation of a Purkinje cell-specific promoter by homeodomain proteins: repression by engrailed-2 vs. synergistic activation by *Hoxa5* and *Hoxb7*. *J Neurobiol* **36**, 559-71.
- Santagati, F., Minoux, M., Ren, S. Y. and Rijli, F. M.** (2005). Temporal requirement of *Hoxa2* in cranial neural crest skeletal morphogenesis. *Development* **132**, 4927-36.
- Santagati, F. and Rijli, F. M.** (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev Neurosci* **4**, 806-18.
- Satokata, I. and Uchiyama, M.** (1995). [Mice carrying null mutations of the homeotic genes *Hoxa10* and *Msx1*]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **40**, 2134-43.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Hough, M. R., Hugo, P., Lawrence, H. J., Largman, C. and Humphries, R. K.** (1997). Overexpression of *HOXB3* in hematopoietic cells causes defective lymphoid development and progressive myeloproliferation. *Immunity* **6**, 13-22.



- Schughart, K., Bieberich, C. J., Eid, R. and Ruddle, F. H.** (1991). A regulatory region from the mouse Hox-2.2 promoter directs gene expression into developing limbs. *Development* **112**, 807-11.
- Scott, M. P. and Weiner, A. J.** (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**, 4115-9.
- Scott, V., Morgan, E. A. and Stadler, H. S.** (2005). Genitourinary functions of Hoxa13 and Hoxd13. *J Biochem (Tokyo)* **137**, 671-6.
- Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshida, M., Kuratani, S., Fujimoto, S., Araki, M., Tajima, N., Araki, K. and Yamamura, K.** (1998). Region-specific expression of murine Hox genes implies the Hox code-mediated patterning of the digestive tract. *Genes Cells* **3**, 51-64.
- Serpente, P., Tumpel, S., Ghyselinck, N. B., Niederreither, K., Wiedemann, L. M., Dollé, P., Chambon, P., Krumlauf, R. and Gould, A. P.** (2005). Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development* **132**, 503-13.
- Sham, M. H., Vesque, C., Nonchev, S., Marshall, H., Frain, M., Gupta, R. D., Whiting, J., Wilkinson, D., Charnay, P. and Krumlauf, R.** (1993). The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* **72**, 183-96.
- Sharpe, J., Nonchev, S., Gould, A., Whiting, J. and Krumlauf, R.** (1998). Selectivity, sharing and competitive interactions in the regulation of Hoxb genes. *Embo J* **17**, 1788-98.
- Shashikant, C. S., Bieberich, C. J., Belting, H. G., Wang, J. C., Borbely, M. A. and Ruddle, F. H.** (1995). Regulation of Hoxc-8 during mouse embryonic development: identification and characterization of critical elements involved in early neural tube expression. *Development* **121**, 4339-47.

**Shen, W. F., Chang, C. P., Rozenfeld, S., Sauvageau, G., Humphries, R. K., Lu, M., Lawrence, H. J., Cleary, M. L. and Largman, C. (1996).** Hox homeodomain proteins exhibit selective complex stabilities with Pbx and DNA. *Nucleic Acids Res* **24**, 898-906.

**Shen, W. F., Montgomery, J. C., Rozenfeld, S., Moskow, J. J., Lawrence, H. J., Buchberg, A. M. and Largman, C. (1997a).** AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 6448-58.

**Shen, W. F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L. G., Lawrence, H. J. and Largman, C. (1999).** HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* **19**, 3051-61.

**Shen, W. F., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J. and Largman, C. (1997b).** The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J Biol Chem* **272**, 8198-206.

**Shimeld, S. M., Gaunt, S. J., Coletta, P. L., Geada, A. M. and Sharpe, P. T. (1993).** Spatial localisation of transcripts of the Hox-C6 gene. *J Anat* **183 ( Pt 3)**, 515-23.

**Shimizu, T., Bae, Y. K., Muraoka, O. and Hibi, M. (2005).** Interaction of Wnt and caudal-related genes in zebrafish posterior body formation. *Dev Biol* **279**, 125-41.

**Simmonds, A. J., dosSantos, G., Livne-Bar, I. and Krause, H. M. (2001).** Apical localization of wingless transcripts is required for wingless signaling. *Cell*. **105**, 197-207.

**Simon, J., Chiang, A. and Bender, W. (1992).** Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the abdA and AbdB homeotic products. *Development*. **114**, 493-505.

**Slupsky, C. M., Sykes, D. B., Gay, G. L. and Sykes, B. D. (2001).** The HoxB1 hexapeptide is a prefolded domain: implications for the Pbx1/Hox interaction. *Protein Sci* **10**, 1244-53.

- So, C. W., Karsunky, H., Wong, P., Weissman, I. L. and Cleary, M. L. (2004).** Leukemic transformation of hematopoietic progenitors by MLL-GAS7 in the absence of Hoxa7 or Hoxa9. *Blood* **103**, 3192-9.
- Spitz, F., Gonzalez, F. and Duboule, D. (2003).** A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the HoxD cluster. *Cell* **113**, 405-17.
- Spitz, F., Gonzalez, F., Peichel, C., Vogt, T. F., Duboule, D. and Zakany, J. (2001a).** Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. *Genes Dev* **15**, 2209-14.
- Spitz, F., Gonzalez, F., Peichel, C., Vogt, T. F., Duboule, D. and Zákány, J. (2001b).** Large scale transgenic and cluster deletion analysis of the HoxD complex separate an ancestral regulatory module from evolutionary innovations. *Genes Dev.* **15**, 2209-14.
- Spitz, F., Herkenne, C., Morris, M. A. and Duboule, D. (2005).** Inversion-induced disruption of the Hoxd cluster leads to the partition of regulatory landscapes. *Nat Genet.* **37**, 889-93. Epub 2005 Jul 3.
- Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L. and Kessel, M. (1996).** Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev* **55**, 91-108.
- Stelnicki, E. J., Komuves, L. G., Kwong, A. O., Holmes, D., Klein, P., Rozenfeld, S., Lawrence, H. J., Adzick, N. S., Harrison, M. and Largman, C. (1998).** HOX homeobox genes exhibit spatial and temporal changes in expression during human skin development. *J Invest Dermatol* **110**, 110-5.
- Struhl, G. (1981).** A homoeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila*. *Nature.* **292**, 635-8.
- Struhl, G. (1982).** Genes controlling segmental specification in the *Drosophila* thorax. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **79**, 7380-4.
- Struhl, G. (1983).** Role of the *esc*<sup>+</sup> gene product in ensuring the selective expression of segment-specific homeotic genes in *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol.* **76**, 297-331.

**Struhl, G. and White, R. A.** (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* **43**, 507-19.

**Studer, M., Gavalas, A., Marshall, H., Ariza-McNaughton, L., Rijli, F. M., Chambon, P. and Krumlauf, R.** (1998). Genetic interactions between Hoxa1 and Hoxb1 reveal new roles in regulation of early hindbrain patterning. *Development* **125**, 1025-36.

**Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A. and Krumlauf, R.** (1996). Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature* **384**, 630-4.

**Studer, M., Pöpperl, H., Marshall, H., Kuroiwa, A. and Krumlauf, R.** (1994). Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* **265**, 1728-32.

**Subramanian, V., Meyer, B. I. and Gruss, P.** (1995). Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**, 641-53.

**Suemori, H.** (1995). [Function of Hox genes in formation of skeletons]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **40**, 2144-51.

**Suemori, H. and Noguchi, S.** (2000). Hox C cluster genes are dispensable for overall body plan of mouse embryonic development. *Dev Biol* **220**, 333-42.

**Suh, E., Chen, L., Taylor, J. and Traber, P. G.** (1994). A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* **14**, 7340-51.

**Swiatek, P. J. and Gridley, T.** (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* **7**, 2071-84.

**Tabariès, S., Lapointe, J., Besch, T., Carter, M., Woollard, J., Tuggle, C. K. and Jeannotte, L.** (2005). Cdx protein interaction with Hoxa5 regulatory sequences contributes to Hoxa5 regional expression along the axial skeleton. *Mol Cell Biol* **25**, 1389-401.

- Takamoto, N., You, L. R., Moses, K., Chiang, C., Zimmer, W. E., Schwartz, R. J., DeMayo, F. J., Tsai, M. J. and Tsai, S. Y.** (2005). COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development* **132**, 2179-89.
- Tanzer, A., Amemiya, C. T., Kim, C. B. and Stadler, P. F.** (2005). Evolution of microRNAs located within Hox gene clusters. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **304**, 75-85.
- Tarchini, B. and Duboule, D.** (2006). Control of Hoxd genes' collinearity during early limb development. *Dev Cell* **10**, 93-103.
- Taylor, H. S., Arici, A., Olive, D. and Igarashi, P.** (1998). HOXA10 is expressed in response to sex steroids at the time of implantation in the human endometrium. *J Clin Invest* **101**, 1379-84.
- Testa, A., Donati, G., Yan, P., Romani, F., Huang, T. H., Vigano, M. A. and Mantovani, R.** (2005). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters. *J Biol Chem* **280**, 13606-15.
- Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G. and Humphries, R. K.** (1999). Enhanced in vivo regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. *Blood* **94**, 2605-12.
- Tiret, L., Le Mouellic, H., Lallemand, Y., Maury, M. and Brulet, P.** (1993). Altering the spatial determinations in the mouse embryos by manipulating the Hox genes. *C R Acad Sci III* **316**, 1009-24.
- Tiret, L., Le Mouellic, H., Maury, M. and Brulet, P.** (1998). Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice. *Development* **125**, 279-91.
- Trainor, P. A., Ariza-McNaughton, L. and Krumlauf, R.** (2002). Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and pre patterning. *Science* **295**, 1288-91.

- Tuggle, C. K., Zákány, J., Cianetti, L., Peschle, C. and Nguyen-Huu, M. C. (1990).** Region-specific enhancers near two mammalian homeo box genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes Dev* **4**, 180-9.
- Uyeno, L. A., Newman-Keagle, J. A., Cheung, I., Hunt, T. K., Young, D. M. and Boudreau, N. (2001).** Hox D3 expression in normal and impaired wound healing. *J Surg Res* **100**, 46-56.
- Valentine, J. W., Erwin, D. H. and Jablonski, D. (1996).** Developmental evolution of metazoan bodyplans: the fossil evidence. *Dev Biol* **173**, 373-81.
- van den Akker, E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B. I. and Deschamps, J. (2002).** Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development*. **129**, 2181-93.
- van den Akker, E., Fromental-Ramain, C., de Graaff, W., Le Mouellic, H., Brulet, P., Chambon, P. and Deschamps, J. (2001).** Axial skeletal patterning in mice lacking all paralogous group 8 Hox genes. *Development* **128**, 1911-21.
- van den Akker, E., Reijnen, M., Korving, J., Brouwer, A., Meijlink, F. and Deschamps, J. (1999).** Targeted inactivation of Hoxb8 affects survival of a spinal ganglion and causes aberrant limb reflexes. *Mech Dev* **89**, 103-14.
- van der Hoeven, F., Zákány, J. and Duboule, D. (1996).** Gene transpositions in the HoxD complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell* **85**, 1025-35.
- van Dijk, M. A., Peltenburg, L. T. and Murre, C. (1995).** Hox gene products modulate the DNA binding activity of Pbx1 and Pbx2. *Mech Dev* **52**, 99-108.
- van Nes, J., de Graaff, W., Lebrin, F., Gerhard, M., Beck, F. and Deschamps, J. (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**, 419-28.
- Vermot, J., Schuhbauer, B., Le Mouellic, H., McCaffery, P., Garnier, J. M., Hentsch, D., Brulet, P., Niederreither, K., Chambon, P., Dollé, P. et al. (2005).** Retinaldehyde

dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development* **132**, 1611-21.

**Vesque, C., Maconochie, M., Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Kuroiwa, A., Charnay, P. and Krumlauf, R.** (1996). Hoxb-2 transcriptional activation in rhombomeres 3 and 5 requires an evolutionarily conserved cis-acting element in addition to the Krox-20 binding site. *Embo J* **15**, 5383-96.

**Vogels, R., Charité, J., de Graaff, W. and Deschamps, J.** (1993). Proximal cis-acting elements cooperate to set Hoxb-7 (Hox-2.3) expression boundaries in transgenic mice. *Development* **118**, 71-82.

**Volpe, M. V., Archavachotikul, K., Bhan, I., Lessin, M. S. and Nielsen, H. C.** (2000a). Association of bronchopulmonary sequestration with expression of the homeobox protein Hoxb-5. *J Pediatr Surg* **35**, 1817-9.

**Volpe, M. V., Martin, A., Vosatka, R. J., Mazzone, C. L. and Nielsen, H. C.** (1997). Hoxb-5 expression in the developing mouse lung suggests a role in branching morphogenesis and epithelial cell fate. *Histochem Cell Biol* **108**, 495-504.

**Volpe, M. V., Pham, L., Lessin, M., Ralston, S. J., Bhan, I., Cutz, E. and Nielsen, H. C.** (2003). Expression of Hoxb-5 during human lung development and in congenital lung malformations. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **67**, 550-6.

**Volpe, M. V., Vosatka, R. J. and Nielsen, H. C.** (2000b). Hoxb-5 control of early airway formation during branching morphogenesis in the developing mouse lung. *Biochim Biophys Acta* **1475**, 337-45.

**Wagner, K., Mincheva, A., Korn, B., Lichter, P. and Pöpperl, H.** (2001). Pbx4, a new Pbx family member on mouse chromosome 8, is expressed during spermatogenesis. *Mech Dev* **103**, 127-31.



- Wahba, G. M., Hostikka, S. L. and Carpenter, E. M.** (2001). The paralogous Hox genes Hoxa10 and Hoxd10 interact to pattern the mouse hindlimb peripheral nervous system and skeleton. *Dev Biol* **231**, 87-102.
- Wakimoto, B. T. and Kaufman, T. C.** (1981). Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with the antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **81**, 51-64.
- Wakimoto, B. T., Turner, F. R. and Kaufman, T. C.** (1984). Defects in embryogenesis in mutants associated with the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* **102**, 147-72.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I. M., Dickson, C. and Mason, I.** (2002). Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Curr Biol* **12**, 1117-23.
- Wang, W. and Malcolm, B. A.** (1999). Two-stage PCR protocol allowing introductions of multiple mutation deletions and insertions using quick-change site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **26**, 680-682.
- Wang, Z., Dollé, P., Cardoso, W. V. and Niederreither, K.** (2006). Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Dev Biol.*
- Warot, X., Fromental-Ramain, C., Fraulob, V., Chambon, P. and Dollé, P.** (1997). Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parts of the digestive and urogenital tracts. *Development* **124**, 4781-91.
- Wedeen, C., Harding, K. and Levine, M.** (1986). Spatial regulation of Antennapedia and bithorax gene expression by the Polycomb locus in *Drosophila*. *Cell.* **44**, 739-48.
- Weerkamp, F., Naber, B. A. E., Koster, E. E. L., Jeannotte, L., van Dongen, J. J. M. and Staal, F. J. T.** (2006). Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: no direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* **20**, 1967-77.

- Wellik, D. M. and Capecchi, M. R.** (2003). Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science* **301**, 363-7.
- Wellik, D. M., Hawkes, P. J. and Capecchi, M. R.** (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev* **16**, 1423-32.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T. and Aster, J. C.** (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-71.
- White, R. A. and Wilcox, M.** (1985). Regulation of the distribution of Ultrabithorax proteins in *Drosophila*. *Nature* **318**, 563-567.
- Whiting, J., Marshall, H., Cook, M., Krumlauf, R., Rigby, P. W., Stott, D. and Allemann, R. K.** (1991). Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of Hox-2.6 gene expression. *Genes Dev* **5**, 2048-59.
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Cook, M., Boncinelli, E. and Krumlauf, R.** (1989). Segmental expression of Hox-2 homoeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* **341**, 405-9.
- Wolgemuth, D. J., Behringer, R. R., Mostoller, M. P., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D.** (1989). Transgenic mice overexpressing the mouse homoeobox-containing gene Hox-1.4 exhibit abnormal gut development. *Nature* **337**, 464-7.
- Wu, X., Vasisht, V., Kosman, D., Reinitz, J. and Small, S.** (2001). Thoracic patterning by the *Drosophila* gap gene hunchback. *Dev Biol.* **237**, 79-92.
- Yaron, Y., McAdara, J. K., Lynch, M., Hughes, E. and Gasson, J. C.** (2001). Identification of novel functional regions important for the activity of HOXB7 in mammalian cells. *J Immunol* **166**, 5058-67.
- Yau, T. O., Kwan, C. T., Jakt, L. M., Stallwood, N., Cordes, S. and Sham, M. H.** (2002). Auto/cross-regulation of Hoxb3 expression in posterior hindbrain and spinal cord. *Dev Biol* **252**, 287-300.

- Yekta, S., Shih, I. H. and Bartel, D. P.** (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594-6.
- Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E. and Korsmeyer, S. J.** (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10632-6.
- Zákány, J. and Duboule, D.** (1999a). Hox genes and the making of sphincters. *Nature* **401**, 761-2.
- Zákány, J. and Duboule, D.** (1999b). Hox genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res* **296**, 19-25.
- Zákány, J., Fromental-Ramain, C., Warot, X. and Duboule, D.** (1997a). Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13695-700.
- Zákány, J., Gérard, M., Favier, B. and Duboule, D.** (1997b). Deletion of a HoxD enhancer induces transcriptional heterochrony leading to transposition of the sacrum. *Embo J* **16**, 4393-402.
- Zákány, J., Kmita, M., Alarcon, P., de la Pompa, J. L. and Duboule, D.** (2001). Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. *Cell* **106**, 207-17.
- Zákány, J., Kmita, M. and Duboule, D.** (2004). A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* **304**, 1669-72.
- Zákány, J., Tuggle, C. K., Patel, M. D. and Nguyen-Huu, M. C.** (1988). Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* **1**, 679-91.
- Zavortink, M. and Sakonju, S.** (1989). The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev* **3**, 1969-81.

**Zhao, J. J., Lazzarini, R. A. and Pick, L.** (1993). The mouse Hox-1.3 gene is functionally equivalent to the *Drosophila* Sex combs reduced gene. *Genes Dev* **7**, 343-54.

**Zhao, J. J., Lazzarini, R. A. and Pick, L.** (1996). Functional dissection of the mouse Hox-a5 gene. *Embo J* **15**, 1313-22.

**Zhao, Y. and Potter, S. S.** (2002). Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev Biol* **244**, 21-36.