



HAL
open science

Element cis-régulateur et facteurs en trans contrôlant l'expression de Krox20 lors de la segmentation du rhombencéphale

Johan Le Men

► **To cite this version:**

Johan Le Men. Element cis-régulateur et facteurs en trans contrôlant l'expression de Krox20 lors de la segmentation du rhombencéphale. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66518 . tel-00832985

HAL Id: tel-00832985

<https://theses.hal.science/tel-00832985>

Submitted on 11 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

École Doctorale Complexité du Vivant CDV (ED 515)

Spécialité Biologie Moléculaire et Cellulaire du Développement

Présentée par

Johan LE MEN

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Élément *cis*-régulateur et facteurs en *trans*
contrôlant l'expression de *Krox20* lors de la
segmentation du rhombencéphale**



Soutenu le 18 Décembre 2012

Devant le jury composé de :

Pr Muriel Umbhauer

Dr René Rezsohazy

Dr Sophie Bel-Vialar

Dr Michel Cohen-Tannoudji

Dr Patrick Charnay

Dr Pascale Gilardi-Hebenstreit

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Membre invité

Cette thèse a été préparée au :

Laboratoire de Développement du Système Nerveux
IBENS, U1024 INSERM, UMR 8197 CNRS
Ecole Normale Supérieure
46 rue d'Ulm, 75230 Paris cedex 05
FRANCE

Remerciements

Je remercie les membres du jury Muriel Umbhauer, René Rezsohazy, Sophie Bel-Vialar et Michel Cohen-Tannoudji pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail.

Je tiens également à adresser mes remerciements les plus chaleureux à Patrick et Pascale qui ont encadré mes travaux de thèse pendant ces trois dernières années. Pascale, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, avec patience et, j'oserais dire, courage !, face à l'ampleur du chantier qu'a été ma formation pour devenir chercheur puisque, lorsque le laboratoire m'a accueilli, je ne connaissais quasiment rien des techniques de laboratoire et j'allais découvrir que bien des subtilités du raisonnement scientifique m'échappaient. Si aujourd'hui, j'arrive à me satisfaire du chemin parcouru, je le dois à ta pédagogie, tes attentions et ton exigence qui m'ont énormément apporté au cours de ces années à tes côtés. Patrick, c'est toi qui m'a ouvert les portes du monde de la recherche, en m'invitant dans ton laboratoire et, avant cela, en me faisant découvrir le fascinant et complexe monde de la biologie du développement, lors d'enseignements que j'ai eu la chance de suivre avec toi. Je ne saurai assez te remercier pour cela et pour m'avoir permis de vivre cette expérience riche qu'a été la thèse dans ton équipe. Ta disponibilité et ta rigueur scientifique furent également un soutien inestimable. Appuyé par la synergie entre vos deux personnalités, je pense avoir eu la chance de bénéficier d'un encadrement d'une rare qualité. Merci également pour l'atmosphère conviviale que vos valeurs humaines ont su créer au sein de l'équipe, qui fait du laboratoire un lieu aussi épanouissant intellectuellement qu'il est gratifiant professionnellement.

J'ai également une pensée pour Yassine et Michel, mes aînés doctorants dans la famille des adeptes de *Krox20*, devenus docteurs il y respectivement six mois et deux ans et qui furent mes premiers modèles. Je reste admiratif de leur infatigable capacité à s'intéresser à tout et à élaborer des raisonnements complexes à partir de connaissances limitées. Travailler à vos côtés fut très enrichissant et c'est avec émotion que je me souviendrais des moments passés avec vous, en particulier de ces discussions interminables, mais toujours intéressantes, qu'occasionnaient vos présences combinées lors des réunions de labo.

Je souhaiterai aussi témoigner de ma reconnaissance à l'ensemble des personnes de l'équipe de Patrick, ou de sa jumelle 'ichthyenne' dirigée par Frédérique. Merci à

Nicolas, mon partenaire hebdomadaire de course pour ta sagesse et ton écoute qui m'ont permis d'appréhender le monde de la recherche – et le monde tout court... – dans toute sa complexité, à Julien, mon *alter ego* doctorant dont l'organisation infiniment supérieure à la mienne m'a permis de ne pas être (trop...) en retard dans les diverses démarches administratives rencontrées au cours d'une vie de doctorant et à Marika pour tes sourires et ton amitié. Je ne saurais oublier Charlotte, sa bonne humeur constante et ses qualités d'expérimentatrice hors paire, Patricia, Alexandre et les deux Aurélie avec lesquels les conversations suivent des fils délicieusement surprenants, et Élodie, qui nous a récemment rejoint et déjà ébloui par ses qualités. J'aurais un mot également pour Piotr, inventeur génial dont les outils me firent gagner beaucoup de temps et une pensée pour le reste de l'équipe – Carole, Graziella, Renata –, ainsi que pour celle de Frédérique – Guillaume, FX, Sylvain, Marina, Aline, Florence, Brigitte, Raquel, Firas et Frédérique lui-même – en m'excusant de ne faire plus que cette simple citation, qui n'est pas à la hauteur de la qualité des moments passés à leurs côtés ni de l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je remercie aussi Stéphane pour son soutien précieux sur les aspects techniques et informatiques du RNA-Seq, ainsi que l'ensemble de son équipe, et en particulier Maria. Merci aussi à Amandine, Guillaume, Christophe et à tout le personnel de l'animalerie souris pour leur sollicitude et leur bonne humeur. J'adresse aussi mes remerciements à l'équipe de Sonia, dont j'ai exagérément occupé le matériel en étant toujours accueilli avec des sourires. Enfin, ma reconnaissance va vers le laboratoire Hyrien qui m'a donné l'asile afin que je puisse écrire ma thèse dans des conditions sereines.

Cette liste serait incomplète sans mentionner Solange, dont j'ai très souvent sollicité les services dans des conditions de relative urgence... Merci d'avoir été disponible et toujours d'aussi bonne volonté.

Enfin, j'aurais une pensée empreinte d'affection pour Virginie et Ryahd, dorénavant émigrés aux Etats-Unis, qui m'ont 'materné', chacun à leur façon, lors de mon arrivée au laboratoire.

J'aimerai également adresser mes remerciements à plusieurs personnes en dehors de l'institut ayant contribué indirectement au bon déroulement de mes années de thèse. Tout d'abord aux 'X-bio', groupe nommé un peu malgré lui et constitué

(initialement) des autres élèves de ma promotion ayant eu l'idée saugrenue de faire une thèse en biologie. Nos rassemblements mensuels furent à la fois l'occasion d'échanger et d'apprendre sur nos passions tout en communiquant sur nos angoisses et difficultés pour nous apercevoir qu'elles nous étaient souvent communes, ce qui les résolvait déjà pour moitié.

J'ai aussi une pensée pour les nageurs du SCUF et à mon entraîneur Guy, qui ont participé pour beaucoup à mon équilibre physique et mental, tout particulièrement au cours de ces quatre derniers mois d'écriture de thèse.

J'aurai également un mot pour une partie de mes proches qui a encouragé et soutenu mes efforts, surtout lors des derniers mois, par un support logistique sans faille. Je vous remercie pour votre patience et votre générosité.

Enfin, j'adresserai mes derniers remerciements à ma famille : à ma mère, dont la propre expérience de thèse a permis d'accompagner mon parcours au cours de ces années, à mon père, pour son infatigable enthousiasme qui a toujours constitué un moteur pour moi, et à mon frère, dont la présence a toujours été un soutien.

MERCI

Résumé

La segmentation du rhombencéphale désigne le processus de subdivision rostro-caudale du cerveau postérieur embryonnaire en 7 compartiments cellulaires, appelés rhombomères (r). Cette subdivision est un mécanisme commun aux vertébrés et essentiel à la mise en place des différentes populations neuronales du cerveau adulte. Elle résulte de l'expression régionalisée d'un ensemble de facteurs de transcription (FT) et de leurs interactions, formant un réseau génétique complexe. Parmi eux, le facteur à doigts à zinc *Krox20* joue un rôle central en couplant la formation et la spécification des rhombomères 3 et 5. Son expression dans deux rhombomères non adjacents et son positionnement en aval de différents FTs et de voies de signalisation en font un modèle pour étudier la régulation transcriptionnelle sur le plan moléculaire et à l'échelle du tissu, ainsi que l'interdépendance entre ces deux niveaux.

Trois éléments régulateurs contrôlant l'expression de *Krox20* ont été caractérisés. Les éléments B et C, actif respectivement dans r5 et r3-r5, sont impliqués dans le démarrage de l'expression de *Krox20* dont l'amplification et le maintien sont ensuite assurés par l'élément autorégulateur A. L'élément C constitue donc une clé d'investigation pour élucider les mécanismes responsables du démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 et de la restriction de son expression à ce rhombomère. Les facteurs Hox, Pbx et Meis ont été identifiés comme des régulateurs directs de l'élément C mais ne sont pas suffisants pour expliquer son profil d'activité restreint.

Afin de poursuivre la caractérisation du contrôle transcriptionnel de *Krox20* dans r3, j'ai entrepris une analyse fonctionnelle des séquences de l'élément C par mutagenèse et ai mis en évidence plusieurs blocs nécessaires à son activité dans r3. De plus, pour accompagner la recherche de régulateurs moléculaires, j'ai établi le répertoire transcriptomique exhaustif, quantitatif et différentiel du rhombencéphale murin en début de segmentation par RNA-Seq. J'ai pu identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de *Krox20* et le contrôle de l'élément C et j'ai en particulier démontré que le FT Sp5 était un activateur direct de l'élément C, en aval de la signalisation FGF. Enfin, j'ai réalisé l'analyse du mutant murin d'excision de l'élément C et mis en évidence de nouvelles propriétés du contrôle transcriptionnel de *Krox20*, dont une coopération en *cis* entre l'élément C et l'élément autorégulateur A nécessaire au maintien de l'expression de *Krox20* dans r3.

Ces travaux illustrent comment la combinaison de différentes approches permet d'élucider un mécanisme de régulation transcriptionnelle complexe jouant un rôle essentiel dans la spécification cellulaire.

Liste des principales abréviations utilisées

3C	:	Capture de Conformation Chromosomique
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN codant
ANR	:	Anterior Neural Ridge
AP	:	Antero-Postérieur
AR	:	Acide Rétinoïque
ARN	:	Acide Ribonucléique
ARNe	:	ARN d'enhancer
ARNm	:	ARN messenger
ARNnc	:	ARN non codant
AVE	:	Anterior Visceral Endoderm
BAC	:	Chromosome Artificiel Bactérien
BMP	:	Bone Morphogenetic Protein
CTCF	:	CCCTC-binding Factor
DNMT	:	DNA MethylTransferase
CBP	:	CREB-Binding Protein
CN	:	Crête Neurale
EMSA	:	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FT	:	Facteurs de Transcription
FGF	:	Fibroblast Growth Factor
FGFR	:	Récepteurs aux FGFs
HAT	:	Histone AcétylTransférase
HES	:	Hairy and Enhancer of Split
HDAC	:	Histone DéACétylase
HDMT	:	Histone DéMéthylTransférase
HMT	:	Histone MéthylTransférase
HOTAIR	:	HOx Transcript Antisens Intergenic RNA
HOTTIP	:	HOxA Transcript at distal TIP
HP1	:	Heterochromatin Protein 1
HS	:	Héparane Sulfate
ICR	:	Imprinting Control Region
INR	:	INIatoR élément
jpc	:	jours post-coïtum
HOT	:	Highly Occupied Tatget
kb	:	10 ³ paires de bases
lincRNA	:	Long Intergenic Non Coding RNA
Mb	:	10 ⁶ paires de bases
MHB	:	Midbrain-Hindbrain Boundary / jonction mésencéphale-rhombencéphale
pb	:	paire de bases
PcG	:	Polycomb Group
PRC	:	Polycomb Repressive Complex
PRE	:	Polycomb Response Element
PHD	:	Plant HomeoDomain
PIC	:	PreInitiation Complex
Pol II	:	ARN POLymérase II
RARE	:	Retinoic Acid Response Element

SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable (complexe de remodelage de la chromatine)
TAF : TBP Associated Factors
TBP : TATA-box Binding Protein (sous-unité de TFIID).
TC : Territoire Chromosomique
TSS : Transcription Start Site
Xist : X-Inactive Specific Transcript

Table des matières

INTRODUCTION	17
I. Mécanismes de régulation de la transcription	20
I.1. Schéma général de la régulation de la transcription	22
I.2. La composition du promoteur et des FTs généraux définit un premier niveau de spécificité	25
I.3. La méthylation de l'ADN module l'utilisation de l'information génétique qui y est contenue	25
I.4. L'environnement chromatinien des promoteurs et des séquences <i>cis</i>-régulatrices conditionne leur fonctionnement	29
I.4.a) Positionnement, stabilité et composition des histones.....	31
I.4.b) Les modifications post-traductionnelles des histones	32
I.4.c) Principales enzymes de modification des histones et FTs pionniers	34
I.4.d) Principaux facteurs effecteurs connus associés aux marques activatrices	37
I.4.e) Effecteurs répresseurs – HP1 et Polycomb.....	37
I.5. Les séquences <i>cis</i>-régulatrices portent l'information d'expression spatio-temporelle des gènes auxquelles elles sont associées	41
I.5.a) L'information de transcription est codée au sein de modules <i>cis</i> -régulateurs	42
I.5.b) La coopérativité directe ou indirecte entre FTs est à l'origine de la spécificité d'action des enhancers.....	43
I.5.c) Les silenciers fixent des FTs inhibant la transcription par le recrutement de co-répresseurs.....	45
I.5.d) Enhancers et promoteurs interagissent à longue distance à travers la formation de boucles d'ADN	47
I.5.e) Les insulateurs séparent les territoires chromatinien et confinent l'action des enhancers	50
I.5.f) Les ARNs non codants peuvent jouer le rôle de séquences <i>cis</i> -régulatrices ou de FTs	53
I.6. La transcription est liée au positionnement des gènes au sein d'un noyau hautement structuré	56
I.7. Découvertes récentes : Pol II en pause et « shadow » enhancers	59
I.7.a) Les Pol II en pause (« paused Polymerase ») prépareraient les gènes à la transcription	59
I.7.b) Les « shadow » enhancers ou « enhancers distribués » confèreraient de la robustesse et de la précision d'expression.....	60
II. Développement du système nerveux central des vertébrés	63
II.1. Morphogénèse du système nerveux central	63
II.2. L'induction neurale	67
II.2.a) L'organisateur de Spemann	67
II.2.b) Les voies de signalisation instruisant l'induction	69
II.3. Régionalisation du tube neural	71
II.3.a) Le modèle « activation-transformation » de Nieuwkoop.....	71
II.3.b) Les acteurs moléculaires de la transformation: Wnt, AR et FGF (figure 14b)	72
II.3.c) Spécification précoce du rhombencéphale et protection par Gbx2.....	75
III. Développement du rhombencéphale des vertébrés	77
III.1. Les rhombomères organisent la neurogénèse dans le rhombencéphale	79
III.2. Les rhombomères constituent des unités de lignage cellulaire	81
III.3. Les rhombomères sont des unités d'expression génique	85

III.3.a) Les gènes Hox et l'identité positionnelle	85
III.3.b) Régulation des gènes Hox dans le rhombencéphale	90
III.4. Les voies de signalisation impliquées dans la segmentation du rhombencéphale	94
III.4.a) Le rôle postériorisant de l'AR.....	94
III.4.b) La voie de signalisation FGF.....	96
III.4.c) Implication potentielle de la voie Wnt.....	105
III.5 Gènes de segmentation et autres acteurs majeurs participant à la mise en place des rhombomères	106
III.5.a) Les gènes Hox des groupes paralogues 1 et 2	106
III.3.b) Les cofacteurs des gènes <i>Hox</i> : les gènes <i>Pbx</i> et <i>Meis/Prep</i>	111
III.5.c) Les gènes <i>Irx</i>	113
III.5.d) Le gène <i>Pou2/Pou5f1/Oct3-4</i>	115
III.5.e) Les gènes <i>Nlz</i>	117
III.5.f) Le gène <i>SP5</i>	119
III.5.g) Le gène <i>MafB (kreisler/valentino)</i>	121
III.5.h) Le gène <i>vHnf1</i>	124
III.5.i) Le gène <i>Krox20</i>	127
IV. RNA-Seq et autres analyses génétiques à grande échelle du rhombencéphale	140
IV.1. Les analyses génétiques à grande échelle du rhombencéphale réalisées à ce jour	140
IV.2. RNA-Seq : Principe et avantages	145
IV.2.a) Principe	145
IV.2.b) Avantages et exploitations.....	147
MATÉRIEL ET MÉTHODES	151
I. Constructions plasmidiques	152
II. Alignements et profils de conservation	154
III. Électroporation <i>in ovo</i> chez le poulet	154
IV. Lignées transgéniques murines et ichthyennes et hybridation <i>in-situ</i>	154
RÉSULTATS	157
I. Redéfinition de l'élément C et caractérisation des séquences conservées	158
I.1. L'incorporation à l'élément C de séquences conservées voisines stabilise son activité et la renforce dans r3	159
I.2. La cinétique d'activité de l'élément C suit trois phases (figure 43)	161
I.3. Une séquence de 60 pb peu conservée confère à Ccœur ses nouvelles propriétés	163
I.4. Les sites Hox HP1 et HP2 sont nécessaires à l'activité de l'élément C et à la réponse à la surexpression de Hoxb1	165
I.5. Les sites Meis, SP/KLF et la boîte E participent au renforcement de l'activité de l'élément C dans r3 et/ou sa répression dans r4	167
I.8. Commentaires	170
I.8.a) Les séquences ajoutées à l'élément C renforcent le ratio d'activité r3/r4.....	170
I.8.b) Les séquences ajoutées inhibent l'activité de l'élément C dans la partie caudale	171
I.8.c) Contribution des différents blocs conservés.....	173
I.8.d) Limites du système d'électroporation poulet.....	174
II. Analyse transcriptomique du rhombencéphale murin par RNA-Seq	177

III. L'action morphogénétique des FGFs sur r3 repose sur l'activité en gradient de l'élément C	208
IV. Analyse du mutant murin <i>Krox20</i>^{Δc}	232
IV.1. Stratégie d'excision de l'élément C	232
IV.2. <i>Krox20</i> commence à s'exprimer mais ne se maintient pas dans r3 chez les souris <i>Krox20</i> ^{Δc}	234
IV.3. Les éléments C et A coopèrent en <i>cis</i> pour assurer le maintien de l'expression de <i>Krox20</i>	236
IV.4. Le territoire d'expression du gène cible <i>EphA4</i> dans r3 est réduit relativement à r4	239
IV.5. Le phénotype d'expression de <i>Krox20</i> est aggravé chez les mutants <i>Krox20</i> ^{KO/Δc}	169
IV.6. Commentaires	241
IV.6. a) Le niveau initial de <i>Krox20</i> dans les mutants <i>Krox20</i> ^{Δc/Δc} est normal et devrait être suffisant pour déclencher l'élément A	241
IV.6. b) L'élément A est inactif sur l'allèle <i>Krox20</i> ^{Δc}	242
IV.6. c) Un pulse initial de <i>Krox20</i> suffit à l'établissement de l'expression d' <i>EphA4</i> dans un r3 plus petit	242
IV.6. d) Interprétations du phénotype du mutant <i>Krox20</i> ^{KO/Δc}	243
DISCUSSION	247
I. L'élément C est-il vraiment un initiateur ?	251
II. La mutagenèse de l'élément C et l'analyse transcriptomique par RNA-Seq ont permis l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de <i>Krox20</i>	253
III. La cartographie transcriptomique du rhombencéphale, une passerelle entre les séquences régulatrices et les régulateurs transcriptionnels	255
IV. Un nouveau modèle pour le démarrage de l'expression de <i>Krox20</i> dans r3 et le positionnement des frontières	258
IV.1. Le profil d'activité de l'élément C suit initialement un gradient r3-r4	258
IV.2 Un nouveau modèle du contrôle de l'expression de <i>Krox20</i> basé sur le profil en gradient de l'activité de l'élément C	259
IV.3. Le profil de l'élément C permet d'expliquer la dynamique et le positionnement final de la frontière r3/r4	263
V. Activité de l'élément C dans r4	265
V.1. Des séquences répressives inhibent l'activité de l'élément C dans r4	265
V.2. Identification des séquences répressives et mise en évidence des interactions entre éléments régulateurs et promoteur	267
V.3. Intégration des séquences répressives au modèle de contrôle transcriptionnel de <i>Krox20</i>	268
VI. Coopération en <i>cis</i> entre les éléments A et C	271
VII. Rôle et identification de l'élément C2	273
ANNEXE	281
Hindbrain patterning requires fine-tuning of early <i>krox20</i> transcription by Sprouty 4	282

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 292

INTRODUCTION

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent différentes approches expérimentales visant l'élucidation des mécanismes gouvernant la régulation du gène *Krox20* dans le rhombencéphale au cours du développement.

En effet, le processus de segmentation du rhombencéphale, par lequel celui-ci se subdivise en territoires à la fois anatomiques et génétiques, est un outil privilégié pour l'étude du contrôle transcriptionnel. L'expression de nombreux gènes y est finement régulée et présente des domaines coïncidant avec un ou plusieurs territoires. Parmi eux, les propriétés d'expression spatio-temporelles de *Krox20*, son rôle central dans le processus de segmentation et son positionnement en aval de différents facteurs de transcription (FTs) et de voies de signalisation en font un modèle puissant pour étudier la régulation transcriptionnelle.

La première partie de cette introduction présente les mécanismes moléculaires connus de régulation générale de la transcription, en incluant les découvertes réalisées au cours des dix dernières années, liées en partie à la généralisation de l'utilisation des techniques de séquençage haut-débit. Les principales étapes de développement du système nerveux menant jusqu'au processus de segmentation du rhombencéphale sont ensuite décrites, afin de dépeindre le contexte de la formation de cette région. Le développement du rhombencéphale lui-même et les principaux acteurs génétiques intervenant dans ce développement sont détaillés dans une troisième partie pour aboutir au rôle de *Krox20* et à sa régulation transcriptionnelle. Enfin, une part importante des résultats présentés s'appuyant sur la réalisation d'une analyse transcriptomique à grande échelle du rhombencéphale, une brève description des étapes de la technologie de RNA-Seq utilisée ainsi que des différentes analyses génétiques à grande échelle déjà entreprises sur le rhombencéphale sera présentée au sein de la dernière partie de cette introduction.

I. Mécanismes de régulation de la transcription

La génétique a connu un essor considérable à partir des années 70, suite à l'élucidation du code génétique et 25 ans après que l'ADN ait été établi comme support moléculaire de l'information génétique (Avery et al., 1944). Armés de ces savoirs, plusieurs générations de scientifiques ont étudié, et continuent d'étudier, comment les plans de codage protéiques contenus dans les gènes façonnent les différentes propriétés anatomiques et biochimiques du vivant, contribuant ainsi à de nombreuses avancées aussi bien médicales qu'économiques.

Parallèlement, et de façon continuellement croissante jusqu'à aujourd'hui, la génétique s'est également intéressée aux mécanismes contrôlant l'expression des gènes. En effet, l'information dictant où, quand, et avec quelle intensité un gène doit être exprimé est au moins aussi importante que celle contenue dans le gène lui-même. Illustrant ce fait, les gènes codant pour des protéines ne constituent qu'environ 2% de l'ADN humain et seraient 10 fois moins nombreux que les régions nucléotidiques impliquées dans le contrôle transcriptionnel (Miller et al., 2004).

La régulation de l'expression de ses gènes va permettre à une bactérie de répondre à des changements environnementaux, en synthétisant par exemple les protéines impliquées dans le métabolisme du lactose seulement en présence de celui-ci et en absence de source d'énergie plus facilement exploitable telle que le glucose. Chez les eucaryotes pluricellulaires, le contrôle transcriptionnel revêt une importance supplémentaire en étant intimement lié à la spécialisation cellulaire puisque permettant aux cellules de n'exprimer que les gènes propres au tissu dont elles ont acquis l'identité. Cette importance accrue est illustrée par la multiplicité des processus de régulation transcriptionnelle chez les métazoaires, aboutissant à un système hautement complexe à la base de la formidable diversité physiologique et comportementale rencontrée au sein du règne animal.

Le développement est une période clé pour les métazoaires pendant laquelle les cellules vont acquérir progressivement leur identité à travers différentes étapes de différenciation. La régulation transcriptionnelle joue ici encore un rôle central puisque

chaque étape est caractérisée par des modifications majeures du répertoire des gènes exprimés par ces cellules et ces modifications vont dicter aux cellules le chemin identitaire qu'elles doivent suivre. Les gènes impliqués dans le développement figurent parmi les plus finement régulés et sont étudiés comme modèles pour comprendre les mécanismes sous-tendant la régulation transcriptionnelle.

Enfin, la généralisation de l'utilisation des technologies de séquençage haut-débit d'ADN et d'ARN au cours des 5 dernières années a mis à jour un nombre important de phénomènes nouveaux impliqués dans la régulation transcriptionnelle, augmentant encore le degré de complexité associée à cette fonction biologique. La compréhension de ces récentes découvertes n'en est qu'à son commencement et la régulation transcriptionnelle est un des domaines d'étude les plus dynamiques de la génétique aujourd'hui.

L'objet de ce chapitre est de dresser un bilan des connaissances sur les mécanismes moléculaires régulant la transcription, et de décrire comment les dernières découvertes viennent s'intégrer dans les composantes de ce bilan, ou au contraire élargir celui-ci.

I.1. Schéma général de la régulation de la transcription

La transcription en elle-même est un processus relativement simple qui ne requiert *in vitro* qu'une matrice ADN, les nucléotides triphosphates appropriés et l'ARN polymérase II (Pol II) dans le cas de la transcription de gènes codant pour des protéines ou pour la plupart des ARN non codants, hors ARNs ribosomiques ou de transfert. Cependant, la situation est bien plus complexe même au sein du plus simple organisme du fait des processus régulateurs assurant que seule l'information génétique pertinente est exprimée, et non le répertoire complet des gènes de la cellule. Cette régulation peut se situer aux niveaux du démarrage, de l'élongation et de la terminaison de la transcription. Les deux premiers processus au moins peuvent être liés, comme nous le verrons avec le cas des ARN polymérases en pause. L'expression des gènes peut aussi être régulée au niveau post-transcriptionnel à travers la maturation de l'ARN messager, son transport et sa dégradation; au moment de la traduction en protéine et au niveau post-traductionnel par la modification des structures secondaires, tertiaires et quaternaires et la dégradation des protéines au sein de compartiments cellulaires spécialisés. Ici encore, ces processus ne sont pas indépendants. Par exemple, l'appareil transcriptionnel joue un rôle important dans le recrutement de la machinerie responsable de la maturation de l'ARN tandis que l'épissage de l'ARN promeut l'élongation transcriptionnelle (Shatkin and Manley, 2000; Proudfoot et al., 2002). Le démarrage de la transcription reste toutefois l'étape déterminante puisque nécessaire à toutes les autres et il est vraisemblable que la plus grande partie de la régulation se situe à ce niveau.

Chez les organismes « simples », telles que les bactéries, la régulation de la transcription dépend principalement du facteur σ (figure 1a). C'est une sous-unité échangeable de l'ARN polymérase qui va reconnaître l'emplacement de démarrage de la transcription sur la matrice d'ADN. L'utilisation de différents facteurs σ modifie l'affinité de l'ARN polymérase et permet à un sous-ensemble spécifique de gènes d'être exprimé (Gruber and Gross, 2003). En plus de ce premier niveau de régulation, divers activateurs et répresseurs capables de se lier à l'ADN dans un voisinage proche du promoteur vont moduler l'activité des différentes formes d'ARN polymérase en réponse à des modifications environnementales et métaboliques et constituer ainsi une ébauche de réseau régulateur.

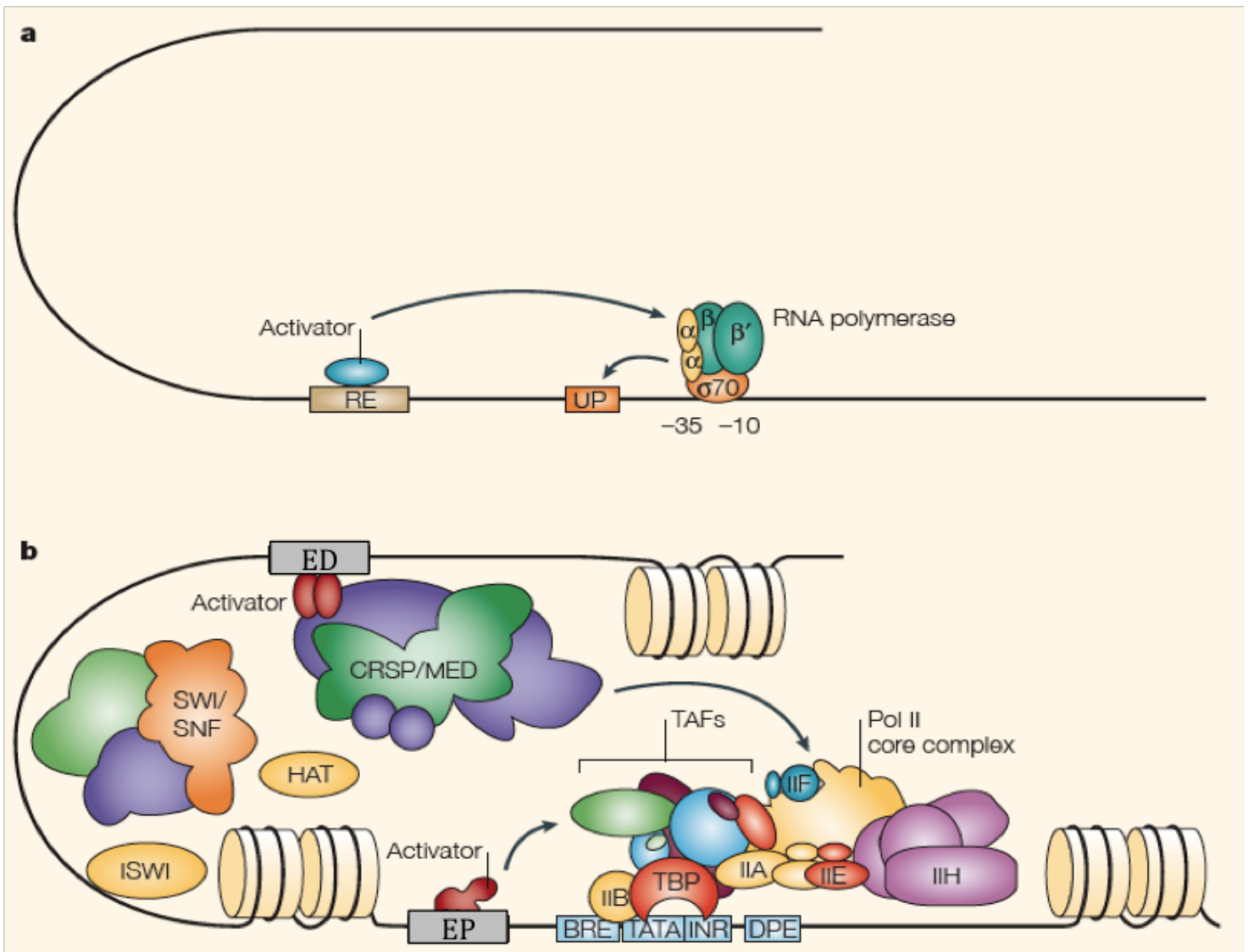


Figure 1. **Modèle d'assemblage de la machinerie de transcription**

a: Chez les eubactéries, le PIC (PreInitiation Complex) consiste simplement en l'association de la Pol II (composée de 5 sous-unités, en vert et jaune) avec un des facteurs σ et éventuellement un activateur ou un répresseur préalablement fixé sur l'ADN via un élément de réponse (RE). Le facteur σ contribue à la reconnaissance du promoteur (élément UP) par la Pol II.

b: Chez les eucaryotes, le PIC est nettement plus complexe et comprend de nombreux facteurs, comme les FTs généraux TFIIA, -B, -D (composé de TBP et des TAFs), -E, -F et -H. Les complexes ISWI, SWI/SNF et les Histone AcétylTransférases (HAT) vont remodeler la chromatine et modifier sa structure tandis que le complexe CRSP/MED agit comme relais entre les FTs liés à des enhanceurs distaux (ED) et la machinerie transcriptionnelle.

BRE : TFIIB Recognition Element, CRSP/MED : Cofactor Required for SP1 activation/MEDIator, DPE : Downstream Promoter Element, EP : Enhancer Proximal, INR : INItiatoR element, ISWI : Imitation SWI, SWI/SNF : SWItch/Sucrose NonFermentable, TAF : TBP-associated Factor, TATA : boîte TATA, TBP : TATA box-Binding Protein.

D'après Taatjes et al, 2004

Chez les métazoaires, la situation est nettement plus complexe du fait de la diversité des structures chromatinienne et du grand nombre de facteurs de transcriptions (FTs) et de co-activateurs impliqués dans le démarrage de la transcription en remodelant ou modifiant la chromatine et en interagissant avec l'appareil transcriptionnel. Le niveau de complexité d'un organisme semble corrélér avec le nombre de FTs, aussi bien absolu que relatif au nombre total de gènes. Près de 10% des gènes de l'homme codent pour des FTs pour seulement 5% chez la levure, ce qui, au vu du fonctionnement hautement combinatoire des FTs, est susceptible d'accroître considérablement les possibilités de contrôle transcriptionnel (pour une revue sur la régulation transcriptionnelle comme source de complexité évolutive, voir Levine and Tjian, 2003).

Le démarrage de la transcription typique d'un gène eucaryote va nécessiter l'intervention de plusieurs types d'acteurs (figure 1b) : les FTs généraux, les FTs spécifiques, les complexes de remodelage et de modification de la chromatine et le complexe co-activateur Mediator. Les FTs généraux TFIIA, -B, -D, -E, -F, et -H vont collectivement agir comme un « facteur σ eucaryote » et recruter la Pol II au niveau du site ADN de démarrage de la transcription, ou TSS (« Transcription Start Site », généralement étiqueté +1) à travers la formation d'un complexe de pré-démarrage de la transcription appelé PIC (« PreInitiation Complexe »). Le PIC se lie au promoteur du gène, qui regroupe les séquences situées au voisinage immédiat du TSS (+/- 50 pb) et comprenant des éléments liant les FTs généraux tels que la boîte TATA. Le promoteur seul n'est généralement pas suffisant pour former le PIC et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle est le plus souvent conditionné par la présence de FTs spécifiques, véritables instructeurs de la transcription qui se fixent sur des séquences d'ADN plus distantes, en amont ou en aval du promoteur. Ces séquences régulatrices agissent en *cis*, c'est-à-dire sur le promoteur situé sur le même chromosome, et plus rarement en *trans* (Duncan, 2002; Williams et al., 2010). Lorsque les FTs qui s'y fixent favorisent la transcription, les séquences régulatrices sont appelées « amplificateurs transcriptionnels » ou *enhancers* (parfois également promoteur proximal quand les séquences sont proches du TSS). Au contraire, les séquences liant des FTs inhibant la transcription sont des « répresseurs transcriptionnels » ou *silencers*. Les FTs spécifiques favorisent la formation du PIC en interagissant avec le Mediator, qui est un complexe co-activateur composé de nombreuses sous-unités pouvant lier et stabiliser le PIC. Le

Mediator est également impliqué dans plusieurs fonctions en aval du démarrage de la transcription (Casamassimi and Napoli, 2007). Ce sont également les FTs qui vont permettre le recrutement des enzymes de remodelage de la chromatine, comme le complexe SWI/SNF, ou de modification des histones, tels que les déacétylases, afin de permettre l'établissement d'un environnement favorable à la transcription.

En plus de ces différents facteurs et mécanismes, de récentes études ont mis à jour ou souligné l'importance d'un certain nombre de nouveaux acteurs et phénomènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle tels que les ARNs non codants, le phénomène de pause de la Pol II, la structuration nucléaire et les usines de transcription, les régions d'ADN à fort taux d'occupation ou encore les « shadow enhancers ».

I.2. La composition du promoteur et des FTs généraux définit un premier niveau de spécificité

Le premier modèle eucaryote de démarrage de la transcription a été construit à partir d'abondants travaux réalisés chez la levure (Struhl et al., 1998). Il postulait que la formation du PIC démarrait par l'assemblage du complexe multiprotéique TFIID induit par sa liaison à deux motifs : la boîte « TATA » riche en nucléotide A/T, située 35 à 30 pb en amont du TSS et reconnue par la sous-unité TBP (« TATA-box-Binding Protein ») et la séquence INR (« INitiatoR element ») riche en pyrimidine (Smale and Kadonaga, 2003). Cependant, si la plupart des promoteurs de levure contiennent une boîte TATA, il semble que chez les métazoaires l'induction de l'assemblage du PIC par la boîte TATA soit l'exception plutôt que la règle. En effet, des études à grande échelle ont montré que seuls 10 à 20% des promoteurs de mammifères contiennent une boîte TATA fonctionnelle (Gershenson and Ioshikhes, 2005; Cooper et al., 2006), et que ces promoteurs sont majoritairement associés à des gènes exprimés dans des tissus spécifiques (Schug et al., 2005). Des observations similaires ont été réalisées chez la drosophile ou chez *A. thaliana* (Molina and Grotewold, 2005; Ohler, 2006).

L'INR seul est suffisant pour induire la formation du PIC et le démarrage de la transcription bien que les deux motifs puissent agir en synergie (pour une revue sur les différents éléments de promoteur et leur rôle, voir Sandelin et al., 2007). Ainsi, on trouve des promoteurs contenant la boîte TATA seule (8% selon Gershenson and

Ioshikhes, 2005), l'élément INR seul (35%), les deux éléments (14%) ou aucun (43%), ce qui souligne la diversité des situations rencontrées. Augmentant encore le potentiel de cette diversité, cinq autres éléments de promoteur ont également été caractérisés à ce jour (figure 2, revus ici : Thomas and Chiang, 2006) :

- les trois premiers sont également reconnus par le FT général TFIID. Il s'agit du DPE (« Downstream Promoter Element ») situé 24-30 pb en aval de beaucoup de promoteurs sans boîte TATA, du MTE (« Motif Ten Element ») trouvé entre les nucléotides +18 et +29 et du DCE (« Downstream Core Element ») composé de trois sous-unités séparées et mutuellement exclusif d'avec le DPE.
- Les éléments BRE^u et BRE^d (« upstream » et « downstream TFIIB Recognition Element ») situés de part et d'autre de la boîte TATA sont reconnus par le facteur général TFIIB.

Un second niveau de diversité se trouve au niveau des FTs généraux, et en particulier de TFIID, dont plusieurs études récentes montrent que la composition varie selon le type cellulaire (revu ici: D'Alessio et al., 2009). Par exemple, le TAF_{II}105 (« TBP-Associated Factor ») est exprimé spécifiquement dans le follicule ovarien (Freiman et al., 2001). De même, en plus de la protéine TBP, il existe trois TRFs (« TBP-Related Factor ») susceptible de moduler les propriétés de reconnaissance du complexe TFIID au promoteur. TRF1 par exemple initie préférentiellement la transcription sur un petit groupe de gènes dépourvus de boîte TATA (Holmes and Tjian, 2000).

Enfin, un nombre important de gènes ne contient pas seulement un mais plusieurs promoteurs (Kimura et al., 2006). À titre d'exemple chez la drosophile, le gène de segmentation *Hunchback* contient un promoteur maternel induisant une expression ubiquitaire dans la lignée germinale et un promoteur zygotique qui restreint l'expression à la moitié antérieure de l'embryon précoce (Schröder et al., 1988). Ces différents promoteurs sont susceptibles d'être reconnus par différents complexes TFIID.

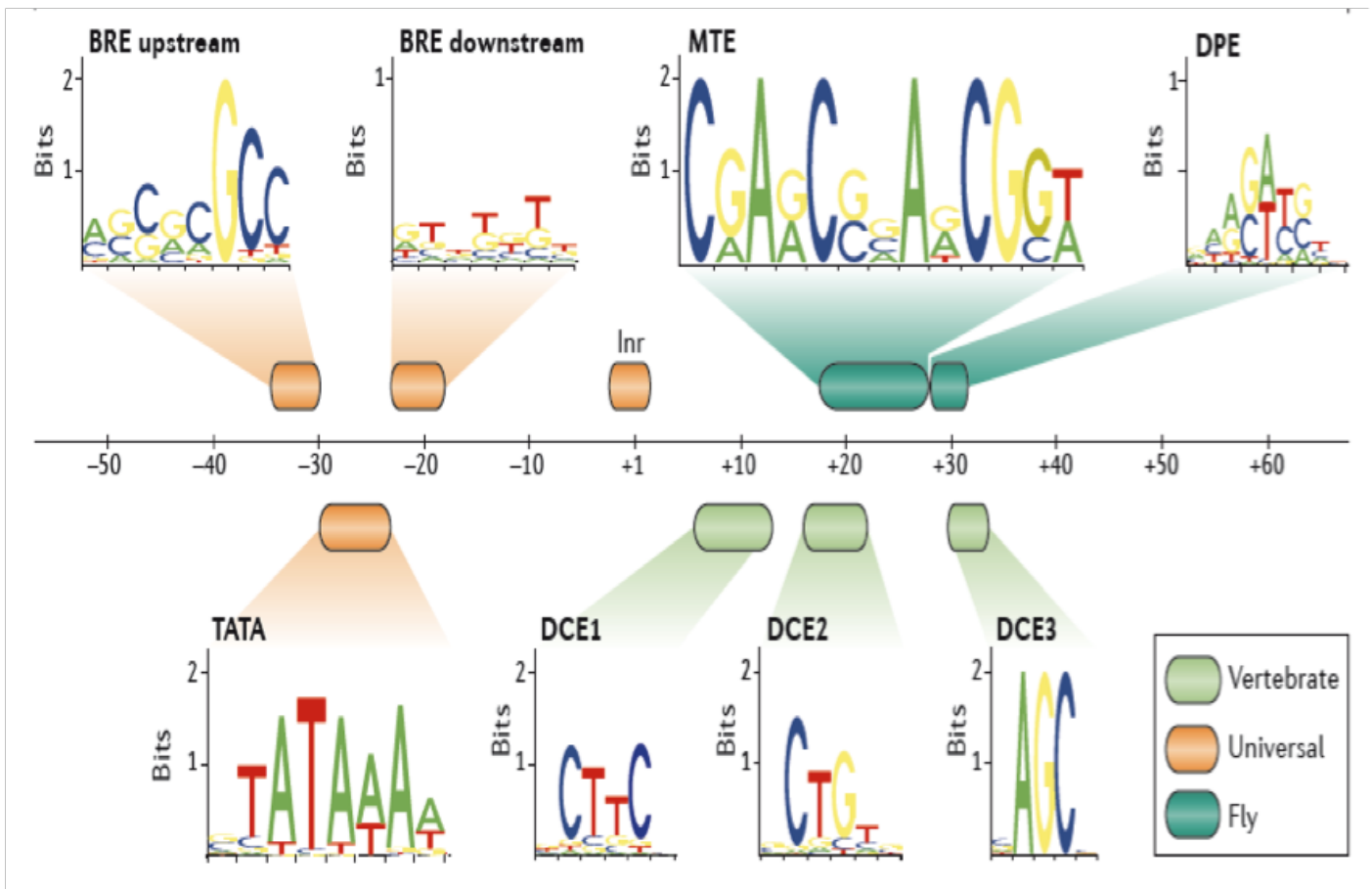


Figure 2. Schéma récapitulatif des éléments de promoteur caractérisés à ce jour

Les motifs consensus sont indiqués hormis pour l'INR, qui varie considérablement d'une étude à l'autre. La plupart des promoteurs ne contiennent qu'une partie de ces éléments, et certains éléments ne sont pas trouvés chez toutes les espèces.

BRE : TFIIB Recognition Element, DCE : Downstream Core Element, DPE : Downstream Promoter Element, INR : INitiatO element, MTE : Motif Ten Element.

D'après Lenhard et al., 2012.

I.3. La méthylation de l'ADN module l'utilisation de l'information génétique qui y est contenue

Les FTs généraux ou spécifiques régulent la transcription en se fixant sur des éléments de promoteur ou des séquences au sein des enhanceurs et silencers. Cette interaction ne dépend pas seulement du motif d'ADN reconnu par le FT mais va être également conditionnée par l'environnement épigénétique de celui-ci. Le terme épigénétique désigne ici l'ensemble des processus héréditaires aboutissant à la modification de l'expression d'un gène sans altération de sa séquence nucléotidique. La méthylation de l'ADN constitue l'une des composantes majeures de cette régulation épigénétique.

Chez les eucaryotes, la méthylation de l'ADN est impliquée dans le maintien de la pluripotence cellulaire, l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale, la stabilité chromosomique en réprimant l'activité des éléments transposables (Bird, 2002; Goll and Bestor, 2005; Howard et al., 2008) et plus généralement dans la régulation de l'expression génique (pour revue, voir Moore et al., 2012). Le plus souvent, la méthylation touche la cytosine du dinucléotide CpG. Les dinucléotides CpG sont sous-représentés chez les mammifères, probablement à cause des propriétés mutagènes des cytosines méthylées (mC), et la majorité se trouve sous forme méthylée. Une exception importante concerne les îlots CpG : ce sont des régions d'environ 1000 pb caractérisées par une forte densité en CpG, fréquemment non méthylées et souvent localisées au niveau du TSS du promoteur de la quasi totalité des gènes de ménage ainsi que d'une partie des gènes exprimés dans des tissus spécifiques et des régulateurs du développement (Deaton and Bird, 2011). De façon intéressante, près de 25% des méthylations d'ADN répertoriées dans les cellules souches embryonnaires murines touchent des cytosines n'appartenant pas à un dinucléotide CpG (Lister et al., 2009), bien que ces méthylations ne soient pas maintenues à l'âge adulte.

La méthylation de l'ADN est en général associée à la répression de la transcription. Dans les régions intergéniques, la méthylation est critique pour réprimer l'activité des quelques 45% de l'ADN humain constitués d'éléments transposables et viraux (Schulz et al., 2006). De même, bien que rare, la méthylation des îlots CpG est associée à une diminution de l'expression des gènes voisins (Irizarry et al., 2009). La situation est plus complexe concernant la méthylation au sein d'un gène : lorsqu'elle

touche le premier exon, elle est associée à une diminution d'expression (Brenet et al., 2011) tandis que les méthylations situées au delà semblent promouvoir plutôt l'expression du gène (Ball et al., 2009; Aran et al., 2011).

Ce sont les DNMTs (« DNA MethylTransferases ») qui catalysent la méthylation de l'ADN. La DNMT1 est impliquée dans la maintien des profils de méthylation, après répllication ou accident, en méthylant le dinucléotide CpG complémentaire d'un mCpG déjà méthylé. Les DNMT3a et b sont capables de produire des méthylations *de novo*. Les mécanismes permettant de cibler celles-ci sur les régions d'ADN sont encore mal compris. Ils impliquent probablement des FTs se liant à des régions d'ADN et recrutant les DNMTs (Brenner et al., 2005). À l'inverse, la fixation de FTs sur les îlots CpG semble être le mécanisme principal les protégeant de la méthylation (Gebhard et al., 2010). Enfin, quelques études suggèrent l'implication d'ARNs non codants (revu ici : Denis et al., 2011).

La méthylation de l'ADN peut influencer sur le contrôle de l'expression des gènes de trois façons. La méthylation d'un site ADN peut abolir sa reconnaissance par un facteur de transcription. Au contraire, certaines protéines vont reconnaître spécifiquement les dinucléotides mCpG et recruter des répresseurs. Enfin, les DNMTs peuvent coopérer avec les enzymes de modification des histones impliquées dans l'assignation d'un état réprimé à un gène.

I.4. L'environnement chromatinien des promoteurs et des séquences *cis*-régulatrices conditionne leur fonctionnement

L'environnement chromatinien dans lequel se trouve l'ADN constitue la deuxième composante majeure de la régulation épigénétique. Chez les eucaryotes, l'ADN est assemblé dans le noyau sous forme de chromatine dont l'unité fondamentale est le nucléosome. Le nucléosome est un octamère d'histones (2 dimères H2A/H2B accolés de part et d'autre d'un noyau de deux dimères H3/H4, figure 3) chargées positivement et autour duquel s'enroulent 146 pb d'ADN. Deux nucléosomes sont séparés par un segment d'ADN d'environ 50 pb. Des mécanismes encore mal connus et impliquant l'histone H1, des protéines chaperonnes, des ARNs non codants et des cations organisent les nucléosomes en une structure d'ordre supérieure qui compacte l'ADN et définit des

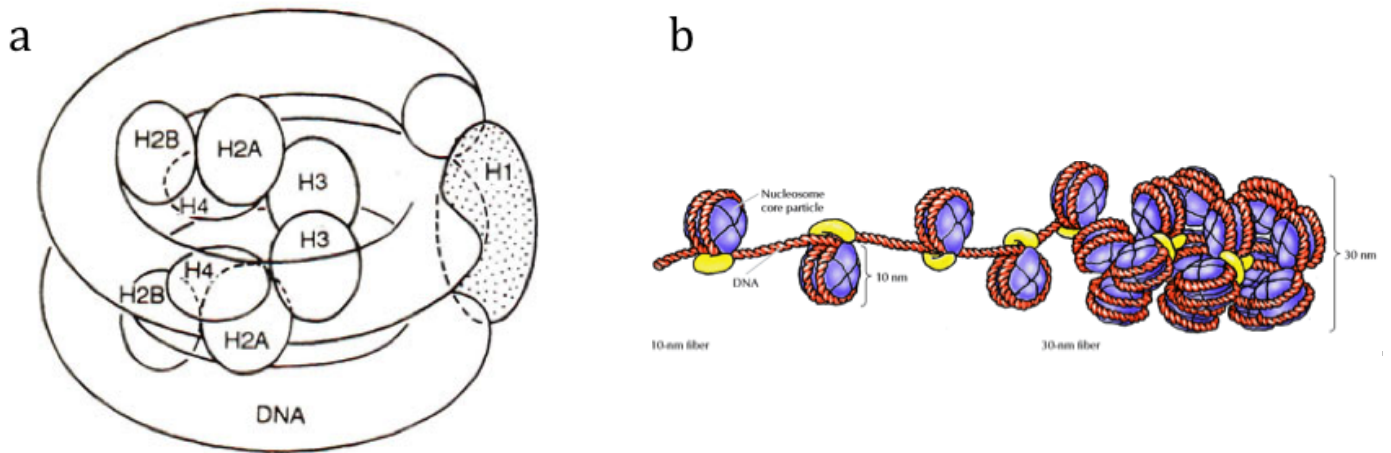


Figure 3. **Organisation et modifications des histones**

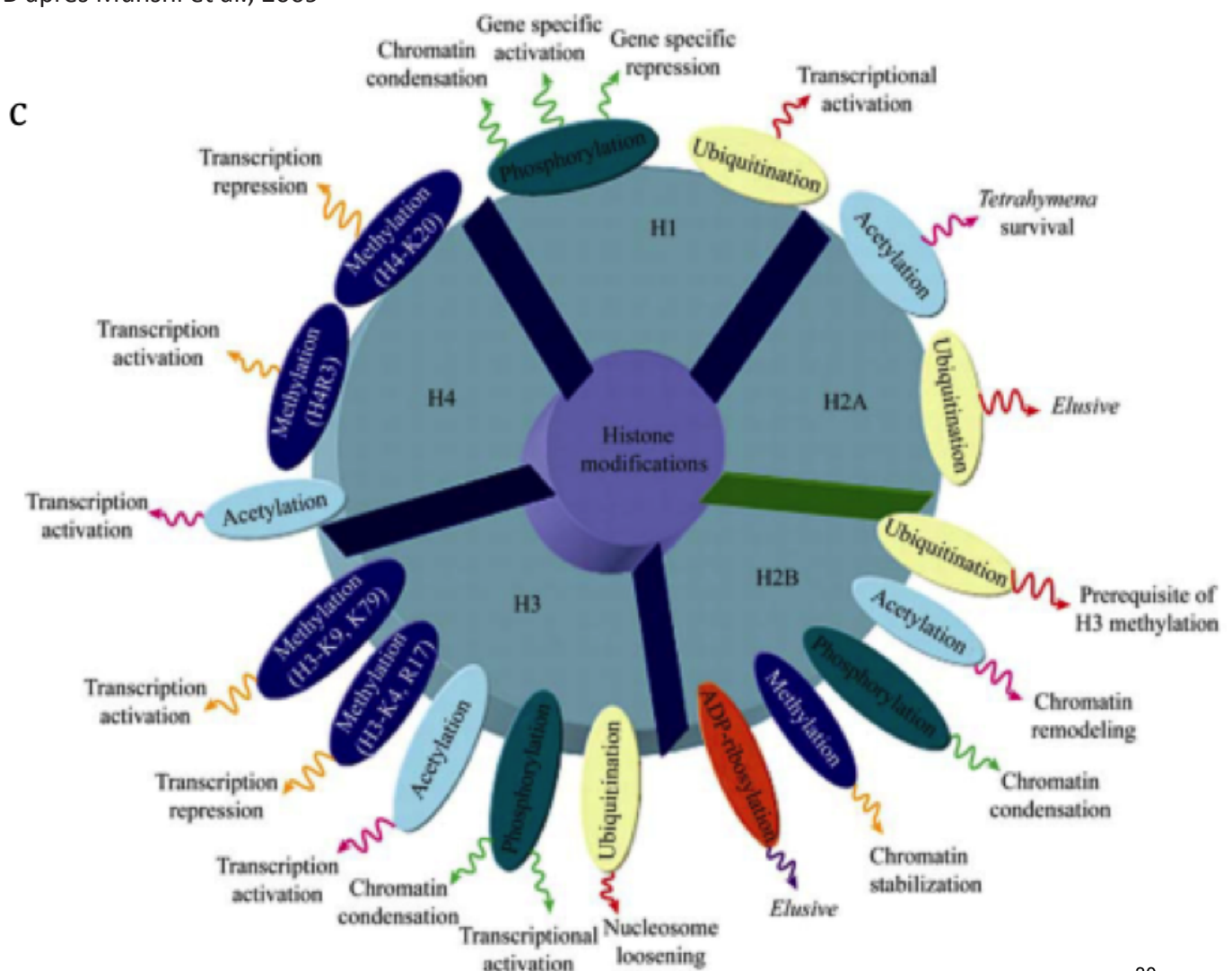
a: Modèle représentant l'arrangement spatial des histones au sein du nucléosome: les histones H3 et H4 forment un tétramère sur lequel viennent s'apposer deux dimères H2A/H2B. Il en résulte un octamère autour duquel 140-150pb d'ADN sont enroulés. L'histone H1 réside à la périphérie du nucléosome et lie les nucléosomes entre eux. D'après ePlantScience.com

b: Assemblage moléculaire des nucléosomes. L'ADN (en rouge) est enroulé autour des octamères d'histones (bleu) qui forment le cœur du nucléosome. La structure est verrouillée par l'histone lien H1 (jaune). La fibre de chromatine ainsi formée, d'un diamètre d'environ 10nm est repliée en une fibre plus épaisse de 30nm elle-même organisée en une structure d'ordre supérieur (non représentée). D'après <http://edoc.hu-berlin.de/>

D'après <http://edoc.hu-berlin.de/>

c: Schéma-bilan des différentes modifications d'histone caractérisées et leurs effets.

D'après Munshi et al., 2009



domaines chromosomiques dont la nature va dicter l'état transcriptionnel des gènes. Ainsi, l'hétérochromatine est un état d'ADN condensé et inaccessible à la plupart des FTs et à l'appareil transcriptionnel tandis que l'euchromatine est un état ouvert permettant la transcription. La modulation des différents états chromatinien et le passage de l'un à l'autre sont régulés par un ensemble de facteurs épigénétiques comprenant le positionnement des nucléosomes sur l'ADN, l'incorporation de variants d'histone et surtout les modifications post-traductionnelles des histones.

1.4.a) Positionnement, stabilité et composition des histones

Le positionnement des nucléosomes sur le génome et leur stabilité influence la transcription en masquant des sites de fixations à des FTs généraux ou spécifiques. Dans le cas du gène de l'interféron β par exemple, la transcription est bloquée par la présence d'un nucléosome au niveau du TSS et le déplacement en aval de ce nucléosome est un préalable au recrutement de la Pol II et à la transcription qui suit une induction virale (Ford and Thanos, 2010). Les études sur génome entier montrent que les enhanceurs et les promoteurs des gènes transcriptionnellement actifs sont souvent associés à des faibles taux d'occupation par les histones, ou à la présence de variants d'histone H2A.Z et H3.3, hautement instables et recrutés par des chaperonnes d'histones (Henikoff and Ahmad, 2005; Heintzman et al., 2007; Schones et al., 2008; Jin et al., 2009). Les variants d'histone pourraient également protéger les régions promotrices de la méthylation (Zilberman et al., 2008) et une déficience en variant H2A.Z chez *A. thaliana* conduit à une hyperméthylation.

Les nucléosomes peuvent être déplacés par des enzymes spécialisées de remodelage de la chromatine, tels que le complexe ATP-dépendant SWI/SNF. Certaines régions d'ADN, comme les îlots CpG, seraient aussi intrinsèquement capables de déstabiliser les nucléosomes (Segal et al., 2006; Ramirez-Carrozzi et al., 2009). Enfin, d'autres protéines de liaisons à l'ADN, comme le facteur CTCF dont nous discuterons plus bas, sont également capables d'influencer le positionnement des nucléosomes autour de la région où elles sont fixées (Fu et al., 2008).

I.4.b) Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones sont de petites protéines essentiellement globulaires sauf pour leur « queue » N-terminale, non structurée et cible d'un très grand nombre de modifications post-traductionnelles. Des modifications covalentes ont été caractérisées sur plus de 60 résidus d'histones différents et incluent, entre autres, la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitylation (figure 3, pour revue sur l'ensemble des modifications caractérisées à ce jour et leur fonction, voir Kouzarides, 2007). Ces modifications, ou marques, façonnent l'état chromatinien de la région qu'elles touchent et modulent la transcription à travers trois types d'effets:

- en altérant directement les propriétés intrinsèques du nucléosome modifié, en particulier en neutralisant ou ajoutant des charges qui augmentent la mobilité du nucléosome en abrogeant le contact ADN-histone (Cosgrove et al., 2004).
- en modifiant directement la capacité des nucléosomes à s'intégrer au sein de structures supérieures par la modulation des contacts entre nucléosomes (Shogren-Knaak et al., 2006). L'acétylation des résidus lysine, par exemple, annule la charge du résidu et inhibe la formation de fibres de chromatine.
- en recrutant des médiateurs qui vont favoriser – ou défavoriser – la fixation de FTs et/ou de la machinerie transcriptionnelle, ou modifier les propriétés de la chromatine en la remodelant ou en y induisant des modifications chimiques additionnelles.

Le concept de « code histone » a été proposé pour décrire la relation entre la combinatoire de modifications d'histone et sa traduction en différents états transcriptionnels (Jenuwein and Allis, 2001). Ce concept est quelque peu remis en question aujourd'hui (Becker, 2006), notamment parce qu'une même marque peut-être reconnue par différents facteurs et induira des réponses différentes selon les types cellulaires. Néanmoins, des études récentes portant sur des génomes entiers ont permis d'associer statistiquement un certain nombre de modifications d'histone à différents états transcriptionnels (figure 4, pour revues: Lenhard et al., 2012; Zhou et al., 2011).

De toutes les marques étudiées, il semble que la méthylation joue le rôle le plus important en se distinguant par son mode de fonctionnement hautement spécifique

suivant le résidu d'histone modifié et le degré de modification (mono-, di- ou triméthylation). Par opposition, il semble par exemple que ce soit le niveau global d'acétylation d'un nucléosome ou d'une région chromatinienne qui importe plutôt que les résidus acétylés (Bernstein et al., 2007).

I.4.b)α : Marques au niveau du promoteur

La triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me³) est l'une des marques les mieux caractérisées. Elle est associée à la transcription des gènes ubiquitaires ou exprimés dans des tissus spécifiques chez l'adulte. Chez les gènes du développement, la marque H3K4me³ caractérise un état transcriptionnellement actif lorsqu'elle est combinée à l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27Ac)(Creyghton et al., 2010). Les promoteurs des gènes du développement présentent la particularité de pouvoir également se trouver dans un état bivalent, en portant à la fois des marques d'activation telles que H3K4me³ et des marques de répression comme H3K27me³ reconnues par les complexes répresseurs du groupe Polycomb (PcG) impliqués dans la formation de l'hétérochromatine (Bernstein et al., 2006). Les gènes en état bivalent sont faiblement transcrits et la signification fonctionnelle de cet état n'est pas encore tout à fait comprise aujourd'hui. Il est proposé qu'il pourrait permettre aux gènes du développement d'être réprimé tout en conservant le potentiel d'être activé rapidement suite au déclenchement de programmes de différenciation développementale.

I.4.b)β : Marques au niveau des enhancers

Plusieurs études sur génome entier ont montré qu'un enrichissement en marques H3K4me¹ et H3K4me² et une déplétion en marques H3K4me³ caractérisent la signature chromatinienne des enhancers (Heintzman et al., 2007; Gebhard et al., 2010). Ces modifications seraient acquises au cours des tout premiers stades de développement (Cui et al., 2009) et « affrèteraient » les enhancers pour pouvoir être fonctionnels ultérieurement. De façon similaire aux promoteurs, le remplacement sur l'enhancer de la marque H3K9me³ par H3K9Ac constituerait le signal permettant au gène associé d'être transcriptionnellement actif (pour revue sur les modifications associées aux enhancers : Ong and Corces, 2011).

I.4.b)γ : Marques au niveau du corps des gènes

Les deux marques majeures associées à la transcription sont H3K36me³ et H3K79me² (Barski et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007). De façon intéressante, l'enrichissement en H3K36me³ est plus prononcé au niveau des exons (Kolasinska-Zwierz et al., 2009) et semble être impliqué dans les mécanismes d'épissage, en interagissant avec le positionnement des nucléosomes. À titre d'exemple, l'équipe du Pr. Misteli a montré que le schéma d'épissage du gène *FGFR2* pouvait être modifié en modulant les niveaux de marque H3K36me³ (Luco et al., 2010).

I.4.b)δ : Marques répressives

La di et tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me² et H3K9me³) sont trouvées régulièrement sur des régions d'hétérochromatine de 0.1 à 10 Mb et couvrent environ la moitié du génome (Guelen et al., 2008; Wen et al., 2009). Elles sont associées à un état transcriptionnellement éteint résultant d'une interaction avec la lamina nucléaire (Finlan et al., 2008; Reddy et al., 2008), illustrant l'importance de l'architecture et du positionnement spatiaux de la chromatine dans le noyau pour la régulation de l'expression génétique et dont nous reparlerons plus bas. La marque H3K27me³ quant à elle est reconnue par les complexes répresseurs Polycomb sur lesquels nous reviendrons également (Simon and Kingston, 2009).

I.4.c) Principales enzymes de modification des histones et FTs pionniers

Les modifications d'histone sont catalysées par des enzymes spécialisées. La plupart de ces enzymes appartiennent à d'importants complexes multi-protéiques dont les partenaires vont moduler le recrutement, l'activité et la spécificité (Yang and Seto, 2007). Les enzymes de modification des histones sont au centre de récentes recherches thérapeutiques et un certain nombre de molécules ciblant leur inhibition sont en cours de développement afin d'accompagner le traitement de pathologies telles que le cancer ou les désordres neuropsychiatriques (Arrowsmith et al., 2012).

L'acétylation des histones est catalysée par une balance entre des histone acétyltransférases (HATs) et des histone déacétylases (HDACs). Les HATs de type B sont très conservées et acétylent exclusivement les histones libres cytoplasmiques avant leur incorporation dans la chromatine. Les HATs de type A acétylent les histones

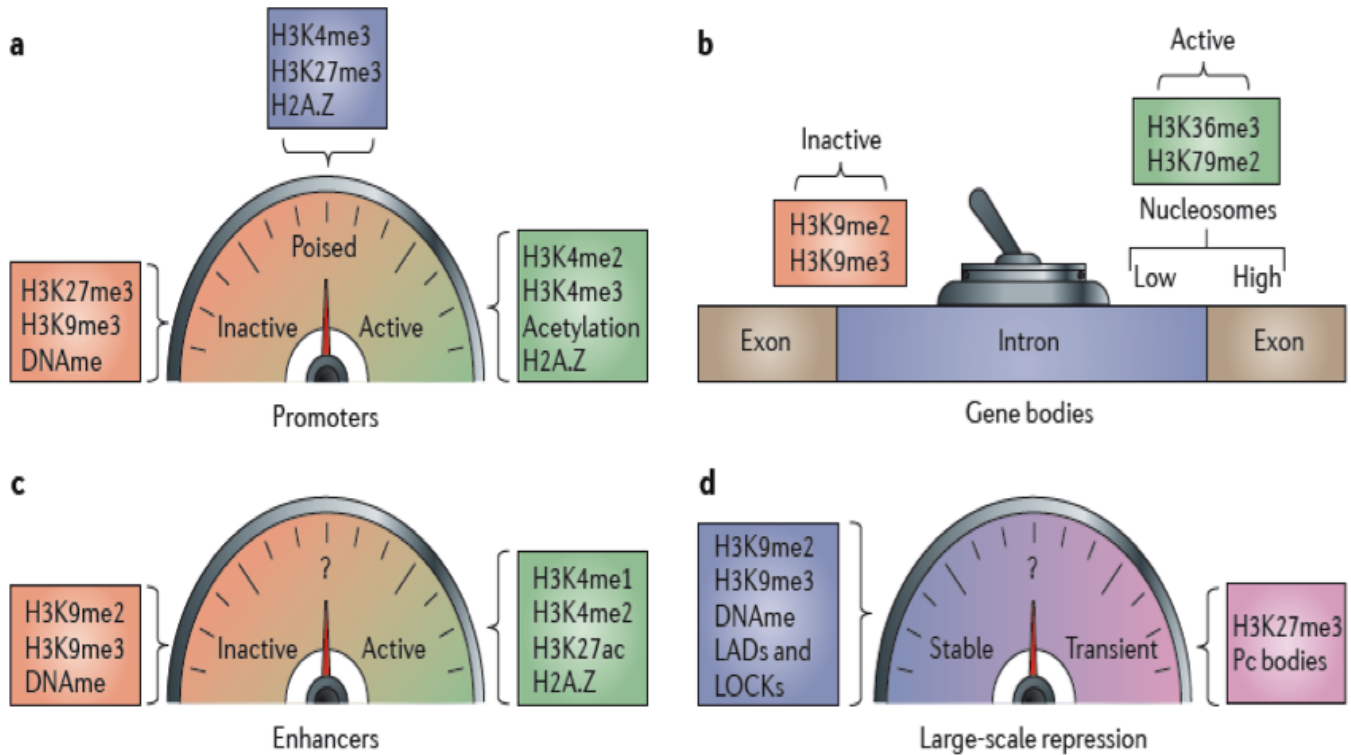


Figure 4. “Tableau de bord” des modifications d’histone selon la région modifiée

a: promoteurs, **b**: corps des gènes, **c**: enhanceurs, **d**: répression à grande échelle. DNAm : DNA methylation. LADs : Lamina-Associated Domains, LOCKs : Large Organized Chromatin K modifications (colocalisent à 80% avec les LADs). Pc bodies : corps Polycomb. D’après Zhou et al., 2011.

nucléosomales et sont une famille nettement plus diverse répartie en 3 classes selon les homologies de séquence d'acides aminés et la structure conformationnelle : GNAT, MYST et CBP/p300 (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). De façon intéressante, la protéine p300 est associée spécifiquement à de nombreux enhanceurs (ainsi qu'aux régions promotrices) au point que plusieurs études l'utilisent comme une marque prédictive pour identifier de nouveaux enhanceurs actifs par immunoprécipitation de la chromatine (Wang et al., 2005; Heintzman et al., 2009; Rada-Iglesias et al., 2011, 2012; Chen et al., 2012).

Au vu de l'effet déstabilisateur de l'acétylation sur la chromatine, il n'est pas étonnant que les HATs apparaissent régulièrement au sein de complexes co-activateurs. Les HDACs au contraire sont des répresseurs transcriptionnels divisés en 4 classes. En cohérence avec le fait que le niveau d'acétylation d'un nucléosome ou d'une région semble importer plus que le résidu acétylé, les HATs comme les HDACs sont caractérisées par une faible spécificité de substrat et une même enzyme peut modifier de nombreux résidus d'histones voire même d'autres protéines.

Au contraire, les enzymes impliquées dans la méthylation sont hautement spécifiques du résidu méthylé, et même du niveau de méthylation (mono-, di- ou tri-) (revu ici : Bannister and Kouzarides, 2011). Toutes les histone méthyltransférases (HMTs) opèrent selon la même voie métabolique et la plupart contiennent un domaine catalytique de type SET (pour Su(var)3-9, 'Enhancer of Zeste' et Trithorax du nom des trois protéines de drosophile au sein duquel ce domaine a été identifié pour la première fois). Les histones déméthylases (HDMTs) contiennent toutes un domaine catalytique de type Jumonji (JM).

Toutes les enzymes de modification des histones nécessitent des partenaires pour être recrutées sur le site qu'elles modifient. Les HDACs par exemple ne lient pas l'ADN directement mais en formant des complexes avec des FTs spécifiques. Une problématique de type œuf et poule semble donc se présenter puisque l'une des conséquences de la modification des histones est justement de déstabiliser les nucléosomes afin de démasquer des sites de fixation à des FTs. Celle-ci est résolue par l'existence des FTs « pionniers », comme FoxA et GATA, capables de se lier à la chromatine condensée et pouvant la rendre compétente à l'activation transcriptionnelle (revu ici : Zaret and Carroll, 2011).

I.4.d) Principaux facteurs effecteurs connus associés aux marques activatrices

Comme nous l'avons vu, les marques d'histones peuvent exercer leur fonction en modifiant directement les propriétés physico-chimiques des histones, ce qui perturbe les interactions ADN-histone ou entre les histones. Ce mode d'action est par exemple associé avec l'acétylation des histones. Les marques d'histone peuvent également recruter des facteurs effecteurs qui vont reconnaître spécifiquement la modification.

La méthylation peut être reconnue par des protéines à doigt PHD (« Plant HomeoDomain ») et par la famille 'Royal' comprenant des protéines à chromodomaine, à domaine Tudor, PWWP ou MBT (« Malignant Brain Tumor »). Une même marque peut être reconnue par différents facteurs. Ainsi la marque d'état actif H3K4me³ peut être reconnue par les protéines ING à doigts PHD qui vont recruter ensuite d'autres enzymes modificatrices de type HATs ou HDACs (Champagne and Kutateladze, 2009). L'enzyme de remodelage de la chromatine CHD1 et l'histone déméthylase JMJD2A peuvent également se fixer sur H3K4me³ à travers un tandem de chromodomaines ou de domaines Tudor respectivement (Sims et al., 2005; Huang et al., 2006).

Les lysines acétylées sont reconnues par des bromodomaines souvent trouvés dans des HATs ou des enzymes de remodelage de la chromatine (Mujtaba et al., 2007). Le fait que beaucoup de protéines de liaison aux histones soient elles-mêmes des enzymes de modification de la chromatine ou les recrutent permet d'expliquer comment une modification épigénétique peut s'étendre aux nucléosomes voisins jusque former des territoires chromatiniens actifs ou silencieux.

Les marques d'histone peuvent aussi fonctionner en bloquant l'interaction entre une histone et un facteur se liant à la chromatine. Ainsi, H3K4me³ bloque la fixation du complexe répresseur NuRD (« Nucleosome Remodeling and histone Deacetylation ») ou celle du facteur DNMT3L (impliqué dans le recrutement des DNMT3a et b) sur la queue N-terminale de l'histone 3 (Zegerman et al., 2002; Adams-Cioaba and Min, 2009).

I.4.e) Effecteurs répresseurs – HP1 et Polycomb

Les marques répressives exercent leur influence par le recrutement d'effecteurs qui affectent à la chromatine un état transcriptionnellement éteint. Deux acteurs principaux jouent ce rôle : l'« Heterochromatin Protein 1 » (HP1) et les complexes répresseurs PcG.

La protéine HP1 se lie à la marque H3K9me³ à travers son chromodomaine N-terminal. HP1 possède des activités déacétylases et méthyltransférases et est indispensable à la formation et au maintien de l'hétérochromatine qu'elle soit constitutive, comme au niveau des régions centromériques et télomériques, ou inductible (Zeng et al., 2010). Conformément à son rôle de répresseur transcriptionnel, le recrutement artificiel de HP1 au niveau des régions promotrices d'un gène entraîne sa répression (Li et al., 2003).

La marque H3K27me³ est reconnue par les facteurs répresseurs PcG, également à travers un chromodomaine. Bien que les cascades HP1-H3K9me³ et Polycomb-H3K27me³ soient toutes deux impliquées dans la répression transcriptionnelle et se chevauchent souvent, la relation fonctionnelle entre ces deux fonctions n'est toujours pas comprise aujourd'hui.

Les protéines PcG sont le sujet d'un nombre exponentiellement croissant d'études depuis 10 ans. Elles sont impliquées chez les vertébrés dans des phénomènes épigénétiques aussi divers que l'inactivation du chromosome X, la plasticité et le renouvellement des cellules-souches, la détermination du destin cellulaire, le développement de cancers et bien évidemment la répression transcriptionnelle (Pasini et al., 2008; Mills, 2010). Les protéines PcG ont été identifiées pour la première fois chez la drosophile à travers leur rôle dans le maintien de la répression des gènes Hox (pour revue : Schwartz and Pirrotta, 2007). De nombreuses expériences d'immunoprécipitation de chromatine sur génome entier ont ensuite révélé des centaines de gènes ciblés par les Polycomb chez la drosophile et les mammifères, le plus souvent des FTs ou des gènes du développement. Les Polycomb sont aujourd'hui considérés représenter un système de répression transcriptionnel global jouant un rôle clé dans le développement multicellulaire et dont les mécanismes d'action sont encore mal compris.

Les protéines PcG sont conservées chez les eucaryotes supérieurs et forment des complexes multiprotéiques. 5 ont été identifiés et deux particulièrement étudiés : PRC1 et PRC2 (« Polycomb Repressive Complex »). PRC1 et PRC2 sont recrutés par des FTs spécifiques au niveau de régions d'ADN cis-régulatrices appelées PREs (« Polycomb Response Element »). Les PREs ne partagent aucune homologie et il n'a pas été possible de déterminer un motif consensus. Chez les mammifères, les deux premiers PREs identifiés l'ont été au sein des régions génomiques PRE-kr régulant le gène *MafB* chez la

souris et D11.12 située entre les gènes HOXD11 et HOXD12 chez l'humain (Sing et al., 2009; Woo et al., 2010). Des sites de fixations pour les facteurs GAGA ou YY1 y ont été trouvés. Il semble que les PREs corrélaient avec une forte densité en dinucléotides CpG et il a récemment été montré que les îlots CpG ne portant pas de facteurs activateurs étaient capables de recruter PRC2 dans des cellules-souches embryonnaires de mammifères (Mikkelsen et al., 2007). Enfin, les ARNs non codants semblent également être impliqués dans le recrutement des protéines PcG chez les mammifères (revu ici : Beisel and Paro, 2011), comme c'est le cas pour *Xist* dans le contexte de l'inactivation du chromosome X ou HOTAIR dans celui de la répression du cluster HOXD. La surexpression de HOTAIR entraînant une mauvaise localisation de PRC2 sur plus de 850 gènes-cibles, il est également proposé que HOTAIR pourrait avoir un rôle plus général, par exemple comme élément structural du complexe PRC2 (Gupta et al., 2010).

Une fois recruté, le complexe PRC2, à travers sa sous-unité catalytique EZH2, dépose la marque répressive H3K27me³ qui va pouvoir servir ensuite de plate-forme d'attachement pour le complexe PRC1. Toutefois, il est très probable que des modifications d'histone ou des facteurs de reconnaissance additionnels soient nécessaires pour l'attachement de PRC1 car les régions marquées H3K27me³ s'étendent sur des kilobases et parfois sur des clusters entiers de gènes tandis que les protéines PRC1 sont localisées sur des sites distincts au niveau des promoteurs, des PREs et des régions 3' des gènes (Schwartz et al., 2006). Les mécanismes par lesquels les protéines PcG induisent un état réprimé ne sont pas encore tout à fait élucidés. La compaction de la chromatine dans un état la rendant inaccessible aux FTs et à la Pol II pourrait être une première façon de mettre en œuvre cette répression. Toutefois, un nombre significatif de promoteurs réprimés par les protéines PcG, y compris les promoteurs des gènes Hox, sont également occupés par des Pol II en pause – dont nous reparlerons plus bas – indiquant que la chromatine est dans un état dynamique et accessible à une partie au moins de la machinerie transcriptionnelle.

De façon intéressante, il semble que la répression par les protéines PcG s'accompagne ou résulte d'une organisation spatiale réunissant les gènes d'un cluster réprimés par les protéines PcG au sein d'une même région nucléaire enrichie en protéines PcG et appelée corps PcG (figure 5a et b, revu ici : Bantignies and Cavalli, 2011). À l'aide de techniques d'hybridation *in situ* fluorescente, d'immunomarquage des protéines PcG et de capture de conformation chromosomique (3C), il a été montré que ce regroupement s'effectue

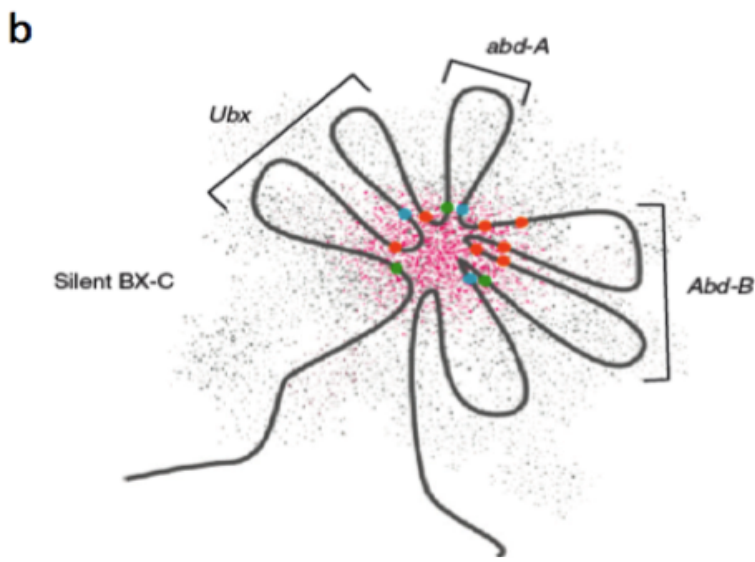
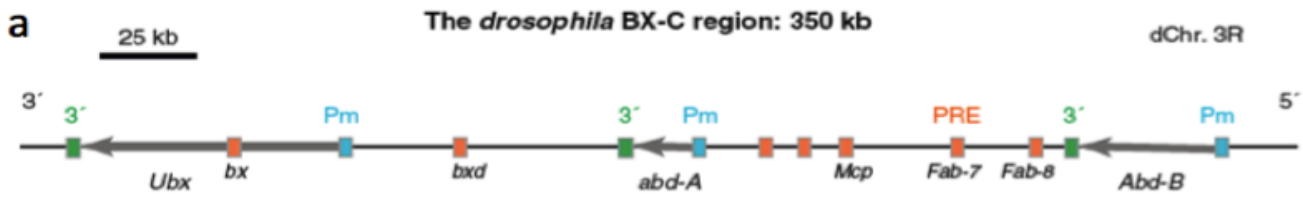


Figure 5. Schéma de l'organisation spatiale des régions chromosomiques réprimées par les Polycomb

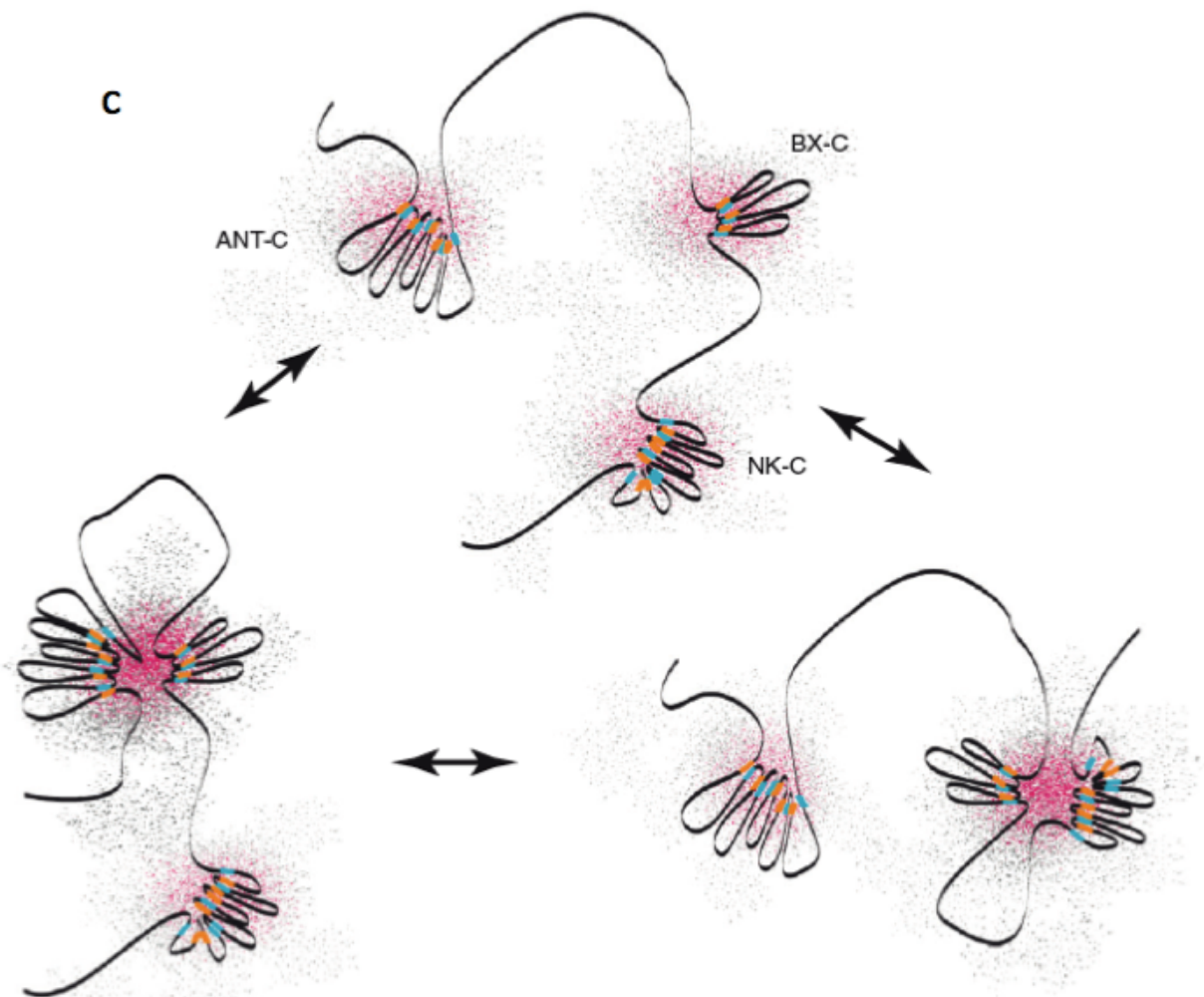
a: Représentation linéaire du cluster BX-C avec les trois gènes *Ubx*, *abd-A* et *Abd-B* figurés par des flèches grises. Les PREs sont en orange, les promoteurs (Pm) en bleu et les régions 3' en vert.

b: Représentation schématique de la structure en moyeu du cluster BX-C, déterminée par analyse 3C. Les interactions physiques entre les régions liées aux PcG, incluant les PREs, les promoteurs et les régions 3' des gènes, entraînent la formation

d'un corps PcG répressif figuré par la concentration de points rouges.

c: Représentation schématique du « chromosome kissing » entre les moyeux de répression des clusters ANT-C, BX-C et NK-C. (PRE : Polycomb Responsive Element ; PcG : Polycomb Group)

D'après Bantignies et al., 2011.



par la formation de boucles d'ADN qui aboutit à la création d'un moyeu de chromatine au sein duquel interagissent les PREs et les promoteurs des gènes réprimés (Lanzuolo et al., 2007). Cette organisation spatiale est conservée chez les mammifères et corrèle avec l'état transcriptionnel des gènes, les gènes transcriptionnellement actifs étant déplacés hors du moyeu (Ferraiuolo et al., 2010). Il est proposé que ce regroupement au sein de corps PcG pourrait permettre la constitution de compartiments nucléaires appauvris en Pol II et enrichis localement en protéines PcG, créant un environnement favorable à la répression transcriptionnelle et minimisant les risques de changement d'état aberrant de la chromatine. En effet, un complexe PcG décroché d'un site aurait de fortes probabilités de se fixer sur un des sites voisins plutôt que d'être complètement délogé. Il est intéressant de noter qu'un niveau encore supérieur d'organisation spatiale semble intervenir dans les mécanismes de répression par les PcG, à travers les phénomènes de « chromosome kissing » où plusieurs moyeux de clusters de gènes réprimés par les PcG viennent se superposer au sein d'un super-assemblage répressif, comme c'est le cas pour les complexes ANT-C, BX-C et NK-C (figure 5c, Bantignies et al., 2011).

1.5. Les séquences *cis*-régulatrices portent l'information d'expression spatio-temporelle des gènes auxquelles elles sont associées

Comme nous l'avons vu, les modifications épigénétiques des histones qui vont dicter le statut transcriptionnel de la chromatine dépendent de la fixation de FTs sur l'ADN. De même, les FTs généraux se fixant sur le promoteur ne sont en général pas suffisants pour induire la formation du PIC et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle nécessite le plus souvent la fixation de FTs spécifiques sur des séquences *cis*-régulatrices. Les FTs constituent donc les instructeurs initiaux promouvant la transcription. Contrairement aux FTs généraux et aux co-activateurs présents pour la plupart dans tous les types cellulaires, l'expression des FTs est finement régulée dans l'espace et le temps et va placer ceux-ci ainsi que les séquences régulatrices en arbitre de la transcription.

1.5.a) L'information de transcription est codée au sein de modules *cis*-régulateurs

Les séquences *cis*-régulatrices sont des fragments d'ADN dont la taille varie de quelques dizaines à quelques milliers de pb et contenant plusieurs sites de fixations pour des FTs divers. Elles peuvent se situer en amont, ou en aval du gène qu'elles régulent, ou même au sein de son cadre ouvert de lecture ou de celui d'un autre gène. Les enhancers et les silenciers contiennent l'information spatio-temporelle et agissent de manière instructive sur le gène régulé tandis que les promoteurs ont essentiellement un rôle permissif. En cohérence avec cette propriété, un enhancer placé à proximité d'un gène hétérologue induira l'expression de celui-ci dans les mêmes territoires que le gène endogène normalement régulé par cet enhancer. Une troisième classe de séquences *cis*-régulatrices, les insulateurs, fixent des frontières aux domaines de régulation selon des mécanismes que nous détaillerons plus bas.

Le découplage entre l'information fonctionnelle, contenue dans la séquence codante du gène, et l'information d'expression spatio-temporelle est à la base d'une grande souplesse évolutive puisqu'elle permet à ces deux paramètres d'évoluer indépendamment. Une seconde propriété renforçant cette souplesse est la division de l'information transcriptionnelle en plusieurs éléments régulateurs : pour les gènes exprimés dans différents tissus et/ou à différents temps, un enhancer distinct prendra en charge chacune des composantes spatio-temporelle de son expression. Il est intéressant de noter à ce propos que les gènes de développement sont souvent associés à un grand nombre de séquences *cis*-régulatrices. Il en résulte que ces séquences vont également pouvoir évoluer de façon indépendante. De fait, il semble que les mécanismes d'évolution touchant les régions régulatrices soient à la base d'une grande diversité phénotypique (Wittkopp and Kalay, 2012; Carroll, 2005)

À titre d'exemple concernant directement le sujet de ce travail, le gène *Krox20* est exprimé pour la première fois dans le rhombencéphale et la crête neurale issue du rhombomère 5, entre 8 et 9,5 jours de développement (jpc) chez la souris (Wilkinson et al., 1989; Schneider-Maunoury et al., 1993). Cette expression est dirigée par au moins 4 enhancers, dont trois sont situés à plusieurs centaines de kb en amont du promoteur de *Krox20* (Ghislain, 2003; Chomette et al., 2006). À 15,5 jpc, l'expression de *Krox20* débute dans les cellules de Schwann immatures puis, après la naissance, s'accroît dans les cellules de Schwann myélinisantes (Topilko et al., 1994; Ghislain et al., 2002). Deux enhancers supplémentaires contrôlent chacune de ces expressions.

Il n'est pas rare que plusieurs enhanceurs associés au même gène possèdent une activité similaire et régulent la même fenêtre spatio-temporelle d'expression, agissant de façon a priori redondante. Plusieurs études récentes ont cependant mis en évidence des cas où cette redondance n'est qu'apparente et disparaît si l'on s'éloigne des conditions environnementales optimales utilisées en laboratoire. Cet aspect est traité plus en détail en I.7.b) avec le thème des « shadow enhanceurs ».

I.5.b) La coopérativité directe ou indirecte entre FTs est à l'origine de la spécificité d'action des enhanceurs

La spécificité d'expression spatio-temporelle induite par les enhanceurs découle de leur fonctionnement en « îlot de régulation » où de nombreux sites de fixation pour différents FTs sont regroupés. En effet, dans la plupart des cas la fixation d'un seul FT ne suffit pas à induire la transcription. À l'inverse, l'activité d'un enhanceur augmente de manière exponentielle avec le nombre de facteurs de transcription présents, un phénomène appelé synergie transcriptionnelle. Ce phénomène est à la base de la spécificité d'action des enhanceurs puisque, dans le cas d'un enhanceur sous le contrôle de trois FTs exprimés différemment, seules les cellules où ces trois facteurs sont présents exprimeront le gène correspondant à un niveau significatif. La diversité des FTs, dont le nombre est estimé à 1500 chez les mammifères, permet donc un nombre de combinaisons quasi infini à l'origine des profils d'expression hautement spécifiques de nombreux gènes.

Un premier mécanisme à la base de la synergie transcriptionnelle est la fixation coopérative des FTs sur l'ADN. Elle peut découler d'une interaction protéine-protéine entre FTs similaires ou différents avant, pendant ou après la fixation et qui va favoriser l'interaction du facteur avec sa séquence. La fixation d'un FT peut également modifier l'accessibilité d'un site voisin pour son facteur sans nécessiter d'interaction protéique (pour revue sur les mécanismes de coopérativité : Georges et al., 2010). C'est le cas par exemple pour l'« enhanceosome » de l'interféron β qui désigne le complexe formé entre l'enhancer et trois complexes hétérodimériques nécessaires à l'activation transcriptionnelle du gène. Alors que le recrutement de chacun des complexes suit un ordre précis – chaque nouveau complexe nécessitant la fixation préalable du précédent –, l'analyse cristallographique du complexe a mis en évidence une absence d'interaction

majeure protéine-protéine (Panne, 2008). En revanche, l'ensemble des 200bp de l'enhancer est en contact avec le multi-complexe protéique qui produit une surface composite et continue constituant une plate-forme de recrutement de co-activateurs. La coopération pour le recrutement de co-activateurs ou de la machinerie transcriptionnelle définit en effet un autre mécanisme de synergie transcriptionnelle (Dilworth and Chambon, 2001; Struhl, 2005). Cette coopération peut être indirecte : des FTs de classes différentes peuvent se fixer indépendamment sur le même enhancer et recruter des co-activateurs qui vont agir de façon synergique (comme une HAT qui déstabilise les nucléosomes et un complexe de remodelage de la chromatine qui les déplace).

La coopérativité entre FTs explique probablement l'existence et l'importance fonctionnelle des sites de faible affinité. En effet, dans certains cas, l'enhancer possède des sites de fixation aux FTs qui ne correspondent pas aux motifs consensus et auxquels les FTs ne se fixent que faiblement. Ainsi, l'enhancer responsable de l'expression dans le disque imaginal de l'aile de drosophile du gène *decapentaplegic (dpp)*, homologue des BMPs chez les vertébrés, possède trois sites de faible affinité pour le facteur *Gliotactin*. Le remplacement de ces sites par des sites de forte affinité résulte en une altération du profil d'expression induit par l'enhancer *dpp*, illustrant l'importance du caractère faiblement affin de ces sites (Parker et al., 2011).

Plus surprenant encore, les FTs sont parfois associés à des régions génomiques ne contenant aucun site de fixation connu. C'est le cas des régions HOT (« Highly Occupied Target »), découvertes récemment chez l'humain, la drosophile et *C. elegans* (Moorman et al., 2006; MacArthur et al., 2009; Gerstein et al., 2010) et qui se caractérisent par une liaison à un nombre particulièrement important de FTs tout en n'étant pas enrichi en motifs de fixation connus pour ces FTs, ce qui suggère un recrutement non-spécifique ou à travers une interaction avec d'autres protéines. L'étude des régions HOT en est à son commencement. De premiers travaux ont montré qu'elles se comportent comme des enhanceurs et sont capables d'induire l'expression du gène auprès duquel elles sont clonées (Kvon et al., 2012).

I.5.c) Les silenciers fixent des FTs inhibant la transcription par le recrutement de co-répresseurs

Quand les FTs se fixent sur une séquence *cis*-régulatrice inhibent la transcription, cette séquence est appelée « silencer ». Le nombre d'enhancers caractérisés à ce jour excède nettement celui des silenciers mais les premiers sont nettement plus faciles à identifier que les seconds. En effet, pour mettre en évidence un enhancer, sa séquence d'ADN est clonée en amont d'un gène rapporteur et on teste sa capacité à induire l'expression du gène dans les conditions voulues. L'identification d'une séquence exclusivement « silencer » nécessitera des expériences plus lourdes puisque le test précédent ne permettra pas de discriminer une séquence neutre vis-à-vis de la transcription d'une séquence l'inhibant. Dans un nombre important de cas, l'identification d'un silencer résulte d'ailleurs de sa capacité à agir en tant qu'enhancer dans d'autres tissus. Par exemple, chez la souris, un des enhancers du cluster de gènes codant pour les protocadhérines α , β et γ agit comme un enhancer neuronal et comme un silencer dans les cellules non neuronales (Kehayova et al., 2011). C'est la nature des FTs fixés sur la séquence *cis*-régulatrice qui va déterminer son mode d'action. Les FTs répresseurs se fixent également souvent au niveau des régions promotrices.

Chez les bactéries, les FTs répresseurs inhibent la transcription principalement en occupant le site de recrutement de la Pol II ou en formant un complexe avec celle-ci qui va retenir la Pol II sur le promoteur et empêcher l'élongation (Heltzel et al., 1990; Lewis, 1996). Chez les eucaryotes, les FTs répresseurs n'ont que rarement été documentés comme contactant directement ou modifiant la machinerie transcriptionnelle. Leurs modes d'actions consistent plutôt à inhiber la fixation de facteurs activateurs sur des séquences voisines ou sur leur propre site et surtout à induire la formation de chromatine répressive par le recrutement de co-répresseurs (revu ici : Beisel and Paro, 2011; Payankulam et al., 2010).

Il n'existe environ qu'une douzaine de complexe co-répresseurs caractérisés à ce jour. La plupart possèdent des activités déacétylases de type HDAC. Certains contiennent également des activités HMT ou déméthylases. Les complexes de remodelage de la chromatine de type SWI/SNF ont en général un rôle de co-activateur mais sont parfois recrutés par des FTs répresseurs pour induire la répression transcriptionnelle et peuvent être considérés comme une classe spéciale de co-répresseurs (Burke and Baniahmad, 2000). Enfin, certains co-répresseurs agissent en

interférant directement avec des co-activateurs comme l'HAT CBP/p300 ou le complexe Mediator (Kim et al., 2005; Gromöller and Lehming, 2000).

Un des complexes co-répresseurs les plus étudiés est le complexe Sin3. Chez les eucaryotes supérieurs, la protéine SIN3 s'associe avec les histones déacétylases HDAC 1 et 2 et cinq autres peptides (Silverstein and Ekwall, 2005). Le complexe Sin3 peut être recruté directement par des FTs comme les récepteurs nucléaires aux hormones p53 et Elk1, ou indirectement par l'interaction avec d'autres complexes co-répresseurs tels que Ncor et SMRT (Heinzel et al., 1997). En plus de l'activité déacétylase, le complexe Sin3 peut être associé à des activités de remodelage de la chromatine de type SWI/SNF et de méthylation des histones ou de l'ADN.

Un autre complexe abondamment étudié est le co-répresseur Groucho de la famille des protéines à répétition WD40. Groucho forme des complexes avec les HDACs et est recruté par les FTs Hairy et Hes chez les métazoaires. Groucho joue un rôle important dans la signalisation Notch et la neurogénèse (Turki-Judeh and Courey, 2012).

Sin3 et Groucho sont des co-répresseurs ubiquitaires présents chez la levure, les plantes et les métazoaires. Un certain nombre de co-répresseurs sont propres aux métazoaires et semblent fonctionner comme des 'add-ons' de la machinerie conservée existante. Ainsi, l'activité HDAC fait partie du co-répresseur CoREST (« copressor for repressor element 1 silencing transcription factor ») recruté par le FT REST pour réguler l'expression de gènes neuronaux. Le complexe CoREST contient également une fonction histone déméthylase à travers la protéine LSD1 (Lee et al., 2005). Un autre complexe propre aux métazoaires très étudié est le co-répresseur CtBP (« C-terminal Binding Protein »). Il possède des enzymes de modification des histones de type HDAC, HMT et HDMT et intervient dans des processus cellulaires importants tels que la différenciation, la tumorigénèse ou l'apoptose (Shi et al., 2003; Chinnadurai, 2003).

Les modifications épigénétiques provoquées par le recrutement de répresseurs vont entraîner l'inhibition de la transcription à travers les cascades HP1-H3K9me³ et Polycomb-H3K27me³.

I.5.d) Enhancers et promoteurs interagissent à longue distance à travers la formation de boucles d'ADN

Chez les métazoaires, les enhancers peuvent être situés très loin du gène qu'ils régulent. Certains éléments régulateurs de *Krox20*, par exemple, se trouvent à plusieurs centaines de kb de son promoteur. Pour d'autres enhancers, comme celui responsable de l'expression de Sonic hedgehog (*Shh*) dans le bourgeon du membre, la distance est de l'ordre du Mb (Sagai et al., 2005). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment des enhancers aussi éloignés pouvaient activer la transcription. Par exemple, l'enhancer pourrait faire naître un signal d'activation qui se propagerait le long de la chromatine jusqu'au promoteur du gène et activerait son expression (Hatzis and Talianidis, 2002; Zhao and Dean, 2004). Sans exclure ce modèle, l'avènement et le développement des techniques 3C ont mis en évidence le rôle déterminant des interactions physiques entre enhancers et promoteur pour promouvoir la transcription, à travers la formation de boucles d'ADN (figure 6a, pour revue : Krivega and Dean, 2012). La formation de boucles chromosomiques a été étudiée en détail sur plusieurs locus de gènes, seuls ou en clusters, tels que les gènes de la globine α et β , la cytokine T helper 2 (T_H2) ou l'interféron γ .

La formation de boucles d'ADN semble être nécessaire à la transcription. En effet, plusieurs études ont montré que celle-ci corrèle précisément avec les contacts enhancers-promoteur (Lomvardas et al., 2006; Amano et al., 2009) tandis que la perturbation de la formation des boucles, soit par l'inactivation des acteurs intervenant dans le mécanisme soit par l'insertion de séquences insultrices (voir paragraphe suivant), modifie la production transcriptionnelle (Vakoc et al., 2005; Hou et al., 2008). Il est admis que ce sont les FTs qui promeuvent la formation de boucles d'ADN bien que les protéines impliquées n'aient été identifiées que dans un nombre restreint de cas. Une démonstration plutôt élégante de cette implication a été réalisée par l'équipe de Dimitris Thanos (Nolis et al., 2009). Dans cette étude, l'enhancer du gène *IFN- β* , situé normalement à proximité du promoteur, a été déplacé plusieurs kbs en amont où il n'est plus capable d'induire la transcription. Cette capacité est restaurée par l'introduction d'un site de fixation au FT SP1 à proximité du promoteur qui s'accompagne de la formation d'une boucle d'ADN entre le promoteur et l'enhancer. L'ajout de sites de fixation SP1 « parasite » entre l'enhancer et le promoteur va réduire cette induction transcriptionnelle en promouvant la formation de boucles non productives. La

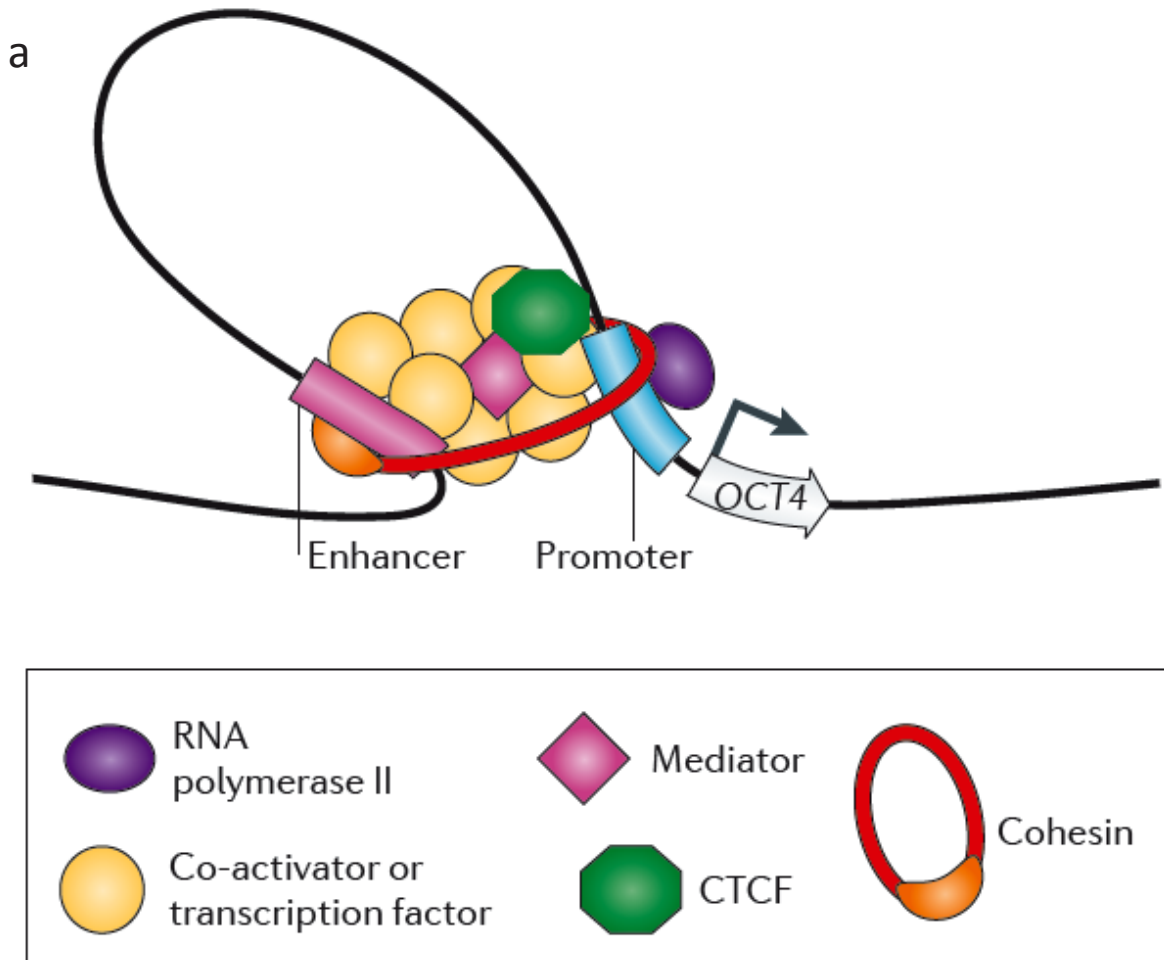
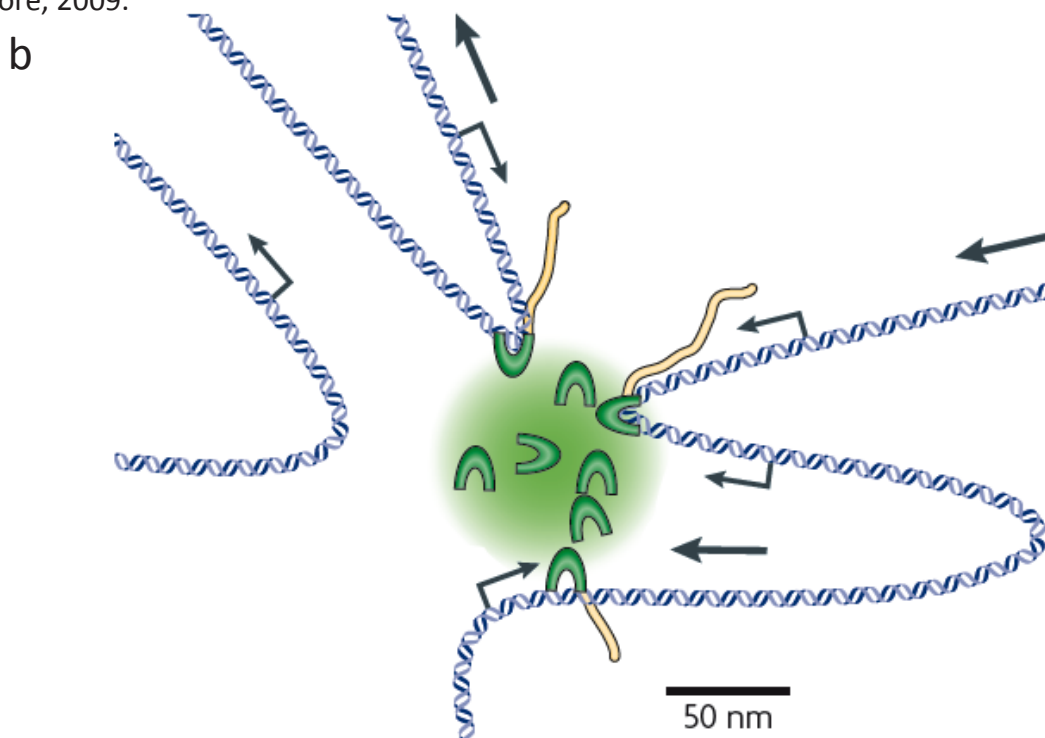


Figure 6. **Organisation spatiale au sein et entre les unités transcriptionnelles**

a: la formation d'une boucle d'ADN, stabilisée par les complexes Mediator, cohésine et le CTCF, permet l'association entre l'enhancer et le promoteur du gène *Oct4* et sa transcription dans les cellules embryonnaires souches. D'après Ong et Corces, 2011.

b: modèle de transcription dans une usine à transcription avec des Pol II (croissants verts) immobilisées. L'ADN est déplacé au fur et à mesure qu'il est lu par les Pol II. Les promoteurs des gènes sont représentés par des flèches coudées. L'ARN nouvellement synthétisé (jaune) est ensuite extrudé. D'après Sutherland et Bickmore, 2009.



stabilisation des boucles d'ADN fait intervenir la cohésine, un complexe protéique plus connu pour son rôle de maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs au moment de la mitose, le complexe Mediator et la protéine CTCF dont nous reparlerons pour son rôle d'insulateur (Kagey et al., 2010).

Les mécanismes d'action par lesquels la formation de boucles promeut la transcription ne sont pas encore clairement élucidés aujourd'hui. Une première hypothèse est que cela favoriserait la concentration locale en facteurs recrutant la Pol II ou que la Pol II pourrait être transférée de l'enhancer au promoteur. À ce titre, il est intéressant de noter qu'une portion importante des enhancers est liée à la Pol II et transcrite à faible niveau (Kim et al., 2010). Il semble également que la formation de boucles soit associée à la relocalisation des gènes transcriptionnellement actifs au sein du noyau, typiquement depuis la périphérie vers des zones plus centrales (Chambeyron and Bickmore, 2004). Cette relocalisation est un prérequis à la transcription et implique des protéines ayant un rôle dans la formation de boucles, telles que Ldb1 (Song et al., 2010). Les gènes relocalisés rejoignent des compartiments spécialisés dans le noyau qui sont enrichis en Pol II : les usines à transcription (figure 6b). D'une façon rappelant la répression par les Polycomb, les gènes hautement co-exprimés s'associent au sein des mêmes usines à transcription indépendamment de leurs positions dans le génome. Par exemple, les gènes régulés par le facteur KLF1, dont la globine β , co-localisent au sein d'usines spécialisées enrichies en facteurs KLF1 (Schoenfelder et al., 2010). Cette étude montre aussi que KLF1 est nécessaire au regroupement de ces gènes au niveau des usines à transcription, soulignant le rôle actif des FTs dans ce phénomène.

Récemment découvertes, les usines à transcription viennent redéfinir notre conception de la transcription chez les métazoaires. Ainsi, plutôt que des Pol II libres dans le noyau qui viendraient s'assembler au niveau des gènes s'exprimant, ce sont plutôt les locus des gènes activés transcriptionnellement qui migreraient vers des compartiments spécialisés dans la transcription et spécifiques des FTs qui les régulent. Il est même proposé que les Pol II seraient immobiles dans les usines à transcription et que ce sont les matrices ADN des gènes qui seraient enfilées dans les Pol II au fur et à mesure de la transcription. Bien entendu, il est possible que ces deux mécanismes coexistent au sein des noyaux eucaryotes.

I.5.e) Les insulateurs séparent les territoires chromatinien et confinent l'action des enhancers

La capacité des enhancers à agir sur de très longues distances leur confère une grande flexibilité, leur permettant d'activer des gènes non adjacents situés très loin sur le génome. Toutefois, cette propriété qui est au cœur du fonctionnement des enhancers soulève aussi un problème potentiel : comment l'activité des enhancers est-elle restreinte aux seuls gènes cibles ?

Un premier niveau de restriction se trouve dans la reconnaissance spécifique enhancer-promoteur qui va dépendre des sites de fixation aux FTs se trouvant sur l'enhancer et des séquences au niveau du promoteur, en particulier la boîte TATA, l'INR et le DPE (Smale and Kadonaga, 2003). L'association des gènes co-régulés au sein de clusters apporte également, bien qu'indirectement, de la spécificité en rapprochant les gènes co-régulés et les séquences régulatrices contrôlant leur expression.

Il semble cependant que le principal moyen de confinement de l'action des enhancers soit l'utilisation de séquences cis-régulatrices spécialisées dites « insultrices ». Les insulateurs vont agir soit en régulant les interactions entre un enhancer et son promoteur soit en bloquant la propagation de l'hétérochromatine.

Les insulateurs qui perturbent la communication entre un enhancer et son promoteur lorsqu'ils sont placés entre les deux sont appelés « enhancer-blockers ». L'archétype de l'enhancer-blocker chez les mammifères est l'insulateur situé entre les gènes *IGF2* et *H19*, ces deux gènes étant soumis à l'empreinte parentale. Sur le chromosome paternel, seul le gène *IGF2* est transcrit grâce à l'interaction avec des enhancers situés en aval de *H19* (voir figure 7a). Sur le chromosome maternel, cette interaction est empêchée par la séquestration du promoteur du gène *IGF2* par l'insulateur ICR (« Imprinting Control Region »), situé en amont de *H19*, grâce à la formation d'une boucle d'ADN. Le gène *IGF2* est alors transcriptionnellement inactif tandis que *H19* est exprimé (Kurukuti et al., 2006). La fixation de la protéine CTCF (« CCCTC-binding Factor ») sur l'ICR est nécessaire à la formation de cette boucle.

Le facteur CTCF est également nécessaire à l'activité de la plupart des enhancer-blockers caractérisés à ce jour dont la majorité contient un ou plusieurs sites de fixation pour ce facteur. C'est un FT ubiquitaire comprenant un large domaine de fixation à l'ADN composé de 11 doigts à zinc. Une analyse systématique des éléments non codants conservés chez les mammifères a montré que 15 000 d'entre eux possédaient des sites

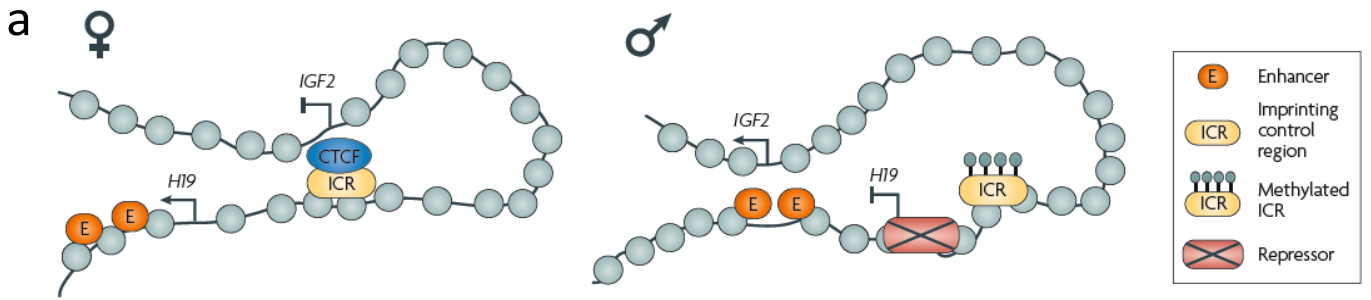


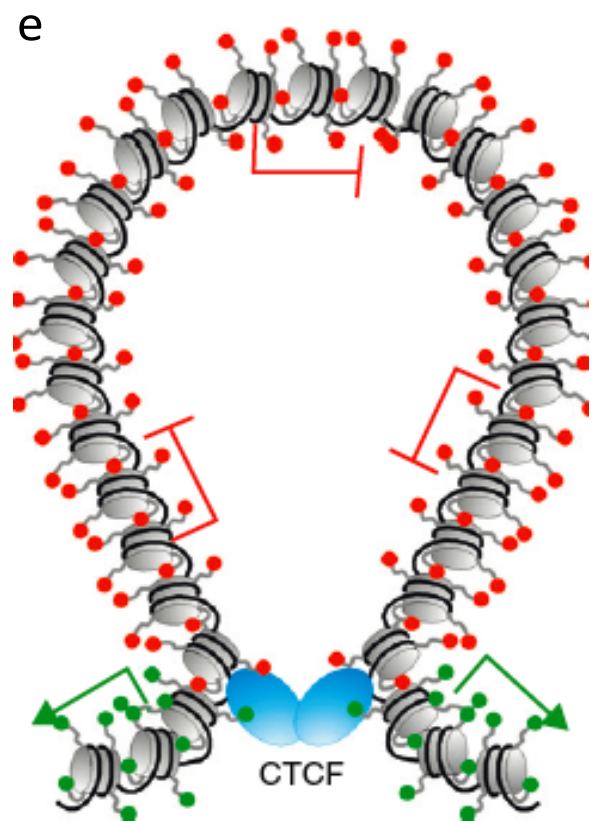
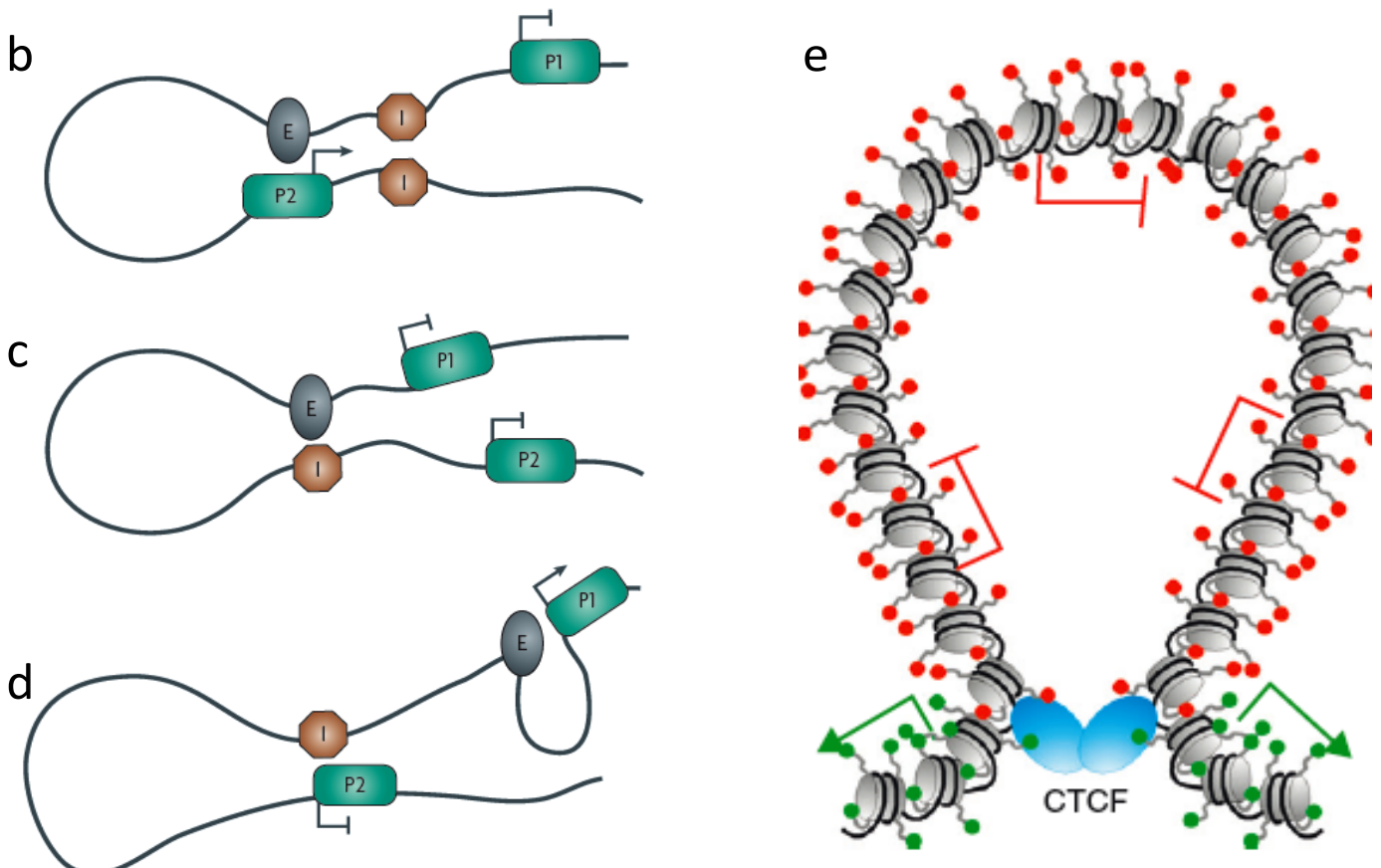
Figure 7. Modes d'action des insulateurs

a: activité de l'enhancer-blocker ICR au niveau du locus *IGF2-H19* soumis à l'empreinte parentale. Sur le chromosome maternel, CTCF se lie à l'ICR et interagit avec le promoteur d'*IGF2*, bloquant son activation par les enhancers situés en aval qui peuvent alors activer la transcription de *H19*. Sur le chromosome paternel, les sites de fixation à CTCF sont méthylés et CTCF ne peut pas se lier à l'ICR. Les enhancers peuvent activer *IGF2* tandis qu'un répresseur va se fixer sur le promoteur de *H19*. D'après Raab et Kamakaka, 2010.

b-d: Modes d'action des enhancers-blockers. Une paire d'insulateurs (I) peut interagir et placer l'enhancer (E) au sein de la même boucle que le promoteur P2 tout en l'isolant du promoteur P1 (b). Un enhancer-blocker peut aussi séquestrer directement un enhancer (c) ou un promoteur (d) et inhiber son interaction avec son promoteur ou son enhancer respectif.

D'après Raab et Kamakaka, 2010.

e: séparation d'un domaine réprimé (marques d'histone répressives et gènes transcriptionnellement éteints en rouge) et d'un domaine actif (marques d'activation et gènes exprimés en vert) par la formation d'une boucle d'ADN suite à l'interaction entre deux insulateurs barrières à CTCF. Les domaines actifs peuvent également être confinés au sein d'une boucle. D'après Yang et Corces, 2012.



de fixation au facteur CTCF (Xie et al., 2007), dont une grande partie sont situés aux extrémités de clusters de gènes co-régulés ou de domaines actifs de chromatine, ce qui suggère que ces éléments sont des enhancers-blockers et ce qui confirme le rôle généralisé de CTCF dans ce mécanisme d'insulation. De façon semblable à p300 constituant une marque prédictive des enhancers actifs, les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suggèrent que CTCF caractérise de façon fiable les séquences insulatrices et puisse être utilisé pour identifier celles-ci (Barski et al., 2007; Cuddapah et al., 2009; Wang et al., 2012). Les sites de fixation au CTCF co-localisent souvent avec la cohésine et celle-ci semble être un cofacteur nécessaire à l'activité de CTCF (Wendt et al., 2008), vraisemblablement en promouvant la formation de boucles d'ADN.

En effet, en plus de la séquestration de promoteur ou d'enhancer, les enhancer-blockers peuvent aussi confiner la transcription en interagissant entre eux pour former des boucles d'ADN qui définiraient des domaines chromosomiques : les enhancers situés dans une boucle ne pourraient pas interagir avec les promoteurs d'une autre boucle (Maeda and Karch, 2007, figure 7b-d). De façon intéressante et similaire à ce que nous avons vu pour la répression dans les corps Polycomb et l'activité transcriptionnelle au sein des usines à transcription, ce regroupement des insulateurs en clusters structure encore un peu plus le noyau en faisant apparaître des « corps d'insulateurs » (Pai et al., 2004; Yang and Corces, 2011).

La formation de boucles permet également aux insulateurs d'agir selon un second type de mécanisme : en opposant une barrière à la propagation de l'hétérochromatine. On parle alors d'enhancers « barrières ». Ici encore, l'implication du facteur CTCF est la mieux caractérisée et des sites CTCF sont souvent trouvés à la frontière entre des domaines de chromatine possédant des marques d'activation d'un côté et de répression de l'autre (Cuddapah et al., 2009). L'importance fonctionnelle de la démarcation de domaines chromatiniens par les insulateurs liés au CTCF est illustrée par l'expression des gènes du cluster *HOXA* dans les fibroblastes de poumon humain en culture (Kim et al., 2011). Dans ces cellules, les gènes *HOXA9-13* sont éteints tandis que les autres gènes du cluster sont transcrits. Conformément à cette répartition des états de transcription, les gènes *HOXA9-13* sont enrichis en modifications d'histones répressives H3K27me³ tandis que les gènes *HOXA1-7* possèdent des marques d'activation comme H3K4me³. Cette distribution des marques dépend de l'interaction entre deux insulateurs à CTCF

situés de part et d'autre de *HOXA9-13*. L'inactivation du facteur CTCF inhibe la formation de la boucle d'ADN entre ces deux insulateurs et entraîne la propagation des marques répressives ainsi que l'extinction des gènes *HOXA6* et *7*. Les enhancers barrières inhibent la propagation de l'hétérochromatine en recrutant des enzymes de remodelage de la chromatine ainsi que des enzymes de modification des histones de type HAT ou H3K4 HMTs (Huang et al., 2007).

Enfin, les insulateurs sont également impliqués dans des processus non liés à la transcription tels que la recombinaison V(D)J au niveau du locus *IGH* (revu ici : Yang and Corces, 2012). Là encore, le facteur CTCF est impliqué. Au vu du rôle hautement multifonctionnel joué par CTCF dans les mécanismes de confinement transcriptionnel ou autres (20% des sites CTCF sont par exemple localisés au niveau des promoteurs), des facteurs additionnels sont nécessaires pour spécifier les différents mécanismes d'action de CTCF, ce que font par exemple les facteurs USF1 et VEZF1 au niveau de l'insulateur barrière HS4 flanquant le cluster de gènes de globine β (Barkess and West, 2012).

1.5.f) Les ARNs non codants peuvent jouer le rôle de séquences *cis*-régulatrices ou de FTs

De récentes études sur génome entier (revues ici : Orom and Shiekhatar, 2011) ont révélé la présence d'un très grand nombre de longs ARNs (>200bp) ne codant pas pour des protéines (ARNnc) bien qu'ils soient épissés et polyadénylés comme les ARN messagers. Les ARNnc peuvent se trouver sous des formes très variées, que ce soit par leur taille – de 200bp à plus de 100 kb – ou leur origine génomique : on trouve des ARNs non codants provenant de régions intergéniques ou des régions non traduites en 3' des gènes mais les promoteurs et les enhancers peuvent également être transcrits. Leur étude en est à son commencement et l'un des grands intérêts associés à ces ARNnc est leur capacité à moduler la transcription. Leur très grand nombre – du même ordre de grandeur que les gènes (Khalil et al., 2009) – suggère qu'ils jouent un rôle important dans la régulation de ce phénomène.

I.5.f)α : Les ARNnc peuvent réprimer la transcription

Les exemples les mieux décrits de l'inhibition en *cis* de la transcription par un ARNnc concernent l'inactivation du chromosome X ou l'empreinte parentale. Selon des mécanismes dont les détails ne sont pas encore élucidés, l'ARNnc *Xist* (« X-Inactive Specific Transcript ») va recouvrir l'ensemble du chromosome X devant être inactivé et induire la formation de chromatine répressive (Chow and Heard, 2009). L'ARNnc *Air* (« Antisense *IGFr2* RNA ») lui va réprimer l'expression de clusters de gènes soumis à l'empreinte parentale et situés sur le même chromosome, parfois à plusieurs centaines de kbs de distance.

Certains ARNnc peuvent également agir en *trans* pour réprimer la transcription. C'est le cas de l'ARNnc HOTAIR (« HOX Transcript Antisense Intergenic RNA ») qui est exprimé depuis le cluster *HOXC* et qui est impliqué chez l'humain dans la répression des gènes du cluster *HOXD* situés sur un chromosome différent (Rinn et al., 2007). HOTAIR a été montré se lier avec le complexe répresseur Polycomb PRC2 et être nécessaire pour le dépôt des marques répressives H3K27me³ au niveau des promoteurs des gènes *HOXD*.

I.5.f)β : Les ARNnc peuvent activer la transcription

Récemment, il a été montré qu'un nombre important d'enhancers était transcrit et recrutait la Pol II (Kim et al., 2010; Ørom et al., 2010). On parle alors d'ARN enhancer (ARNe). La transcription des ARNe corrèle précisément avec le niveau d'expression des gènes voisins. De plus, dans le cas du gène *arc* au moins, la synthèse d'ARNe au niveau de l'enhancer d'*arc* nécessite la présence du promoteur du gène *arc*, ce qui suggère une communication bilatérale entre enhancer et promoteur. Les mécanismes par lesquels les ARNe promeuvent la transcription n'ont pas encore été étudiés. Il est proposé que la transcription des ARNe pourrait établir un paysage chromatinien au niveau de l'enhancer facilitant l'activation du gène ou que les ARNe pourraient jouer un rôle dans la formation de boucles d'ADN en interagissant avec d'autres facteurs.

Une seconde classe d'ARNnc, appelés lincRNA ('long intergenic non coding RNA') et associés à une activité de type enhancer a été identifiée au sein d'une étude récente s'appuyant sur l'annotation GENCODE du génome humain (Harrow et al., 2006; Ørom et al., 2010). Ces ARNnc sont transcrits au sein de loci uniques et complètement intergéniques et leur déplétion entraîne une baisse de l'expression des gènes voisins dans de nombreux types cellulaires ou dans des expériences utilisant des gènes

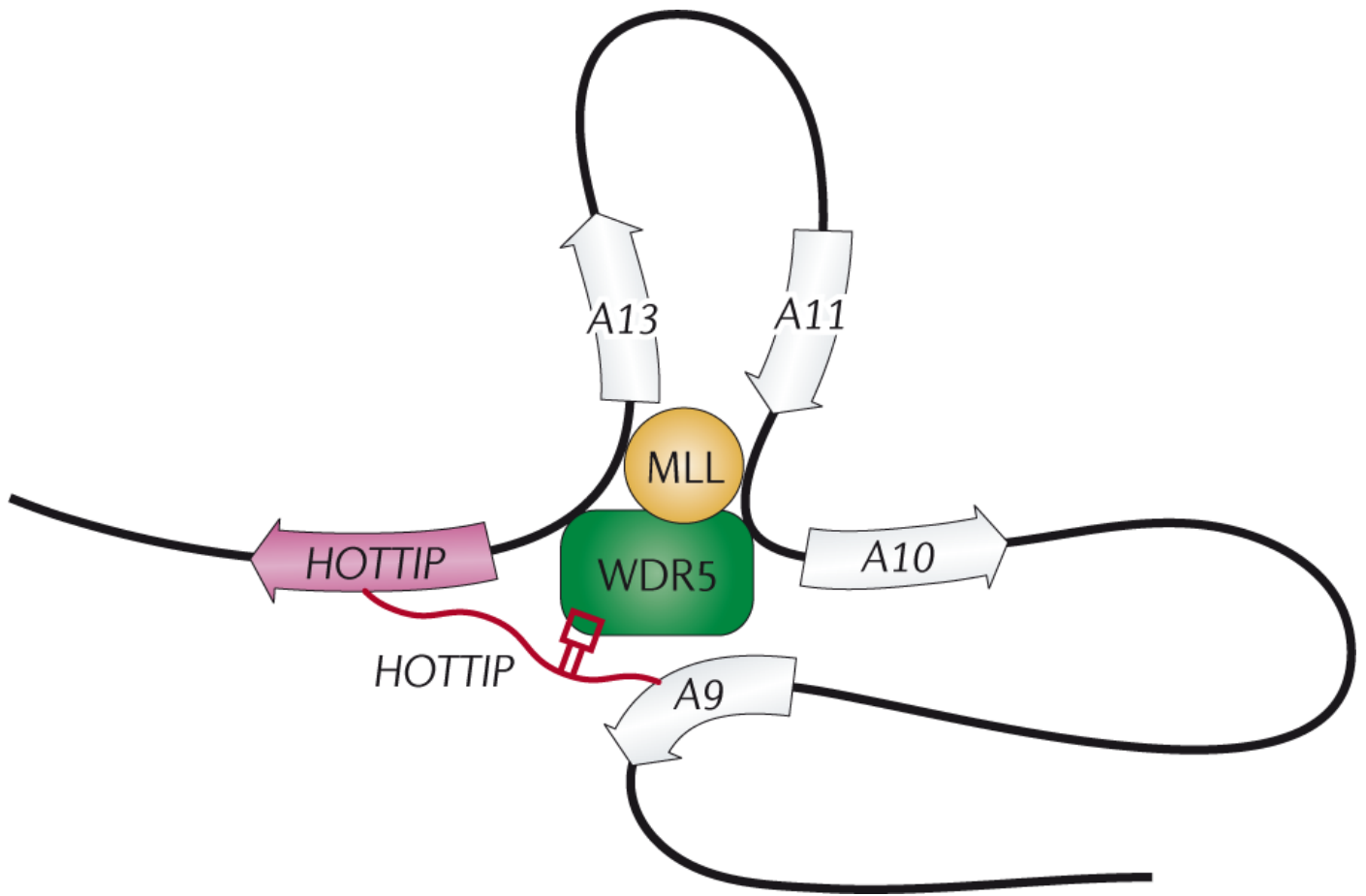


Figure 8. **Activation de la transcription des gènes du cluster HOXA par l'ARNnc HOTTIP**

La formation d'une boucle d'ADN amène l'ARNnc HOTTIP à proximité de ses gènes cibles (*HOXA9* (A9), *HOXA10* (A10), *HOXA11* (A11), *HOXA12* (A12) et *HOXA13* (A13)). HOTTIP lie la protéine WDR5 qui va recruter le complexe MLL à activité histone méthyltransférase. Le recrutement du complexe au niveau de l'extrémité 5' du cluster HOXA par HOTTIP entraîne le dépôt de la marque d'histone H3K4me3 et l'activation de la transcription des gènes.

D'après Ong et Corces, 2011.

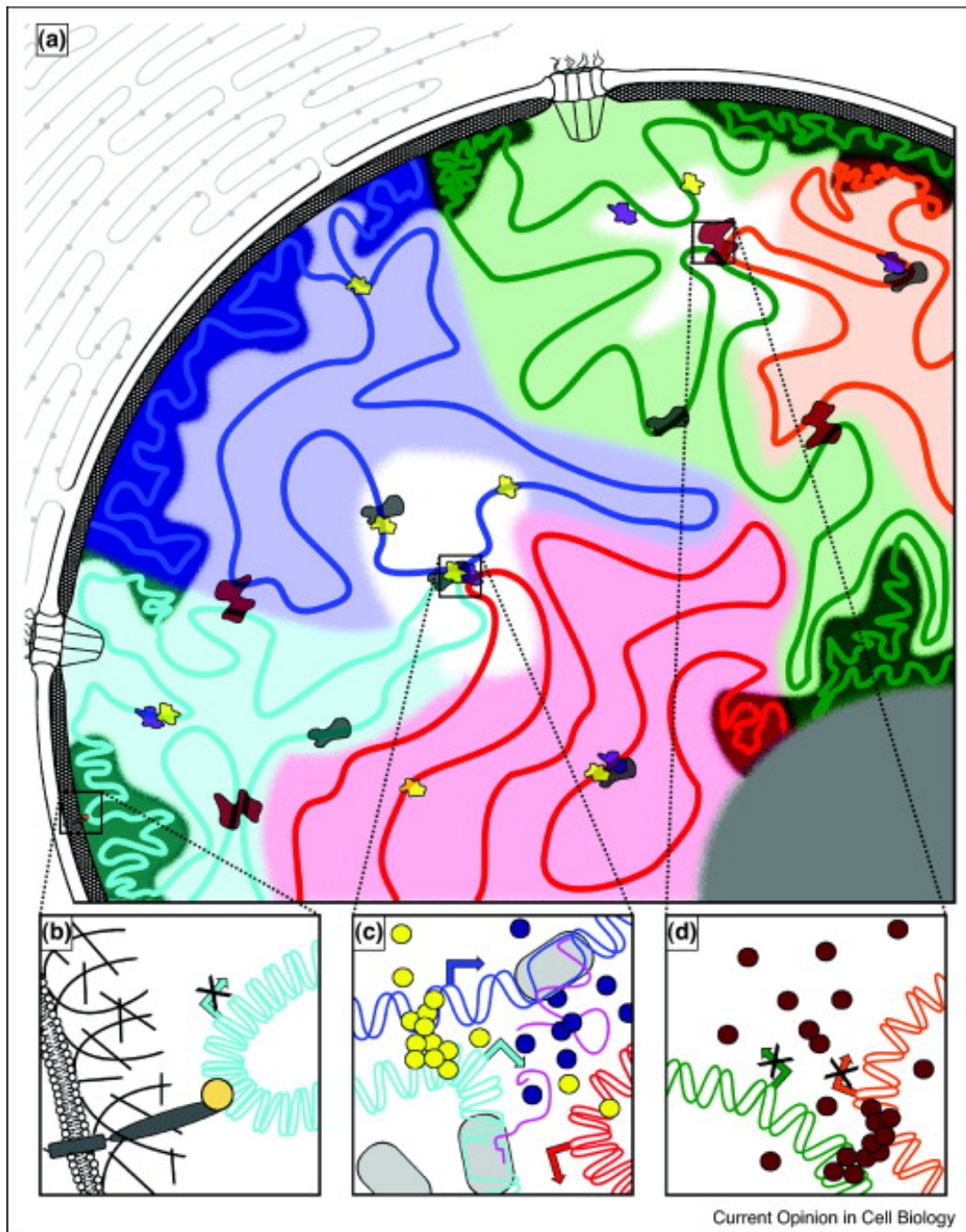
rapporteurs. Un des mécanismes d'action proposés réside dans l'utilisation du lincRNA comme échafaud pour l'assemblage de FTs ou d'enzymes de modification des histones au niveau du promoteur (voir figure 8). Une étude récente (Wang et al., 2011) a identifié le lincRNA HOTTIP (« *HOXA* Transcript at distal TIP ») comme interagissant avec les régions promotrices des gènes du cluster *HOXA* situés en 5'. HOTTIP active l'expression de ces gènes en se liant à la protéine WDR5 (« WD-repeat containing protein ») qui va à son tour recruter le complexe MLL (« mixed-lineage leukemia ») à activité histone méthyltransférase. Ce dernier va déposer les marques activatrices H3K4me³.

Un niveau supplémentaire de complexité dans la régulation de l'expression génétique par les ARNnc est illustré par l'ARNnc *Jpx* qui promeut l'expression de *Xist* (Tian & al., 2010), suggérant que la régulation par les ARNnc ne se limite pas aux gènes codant pour des protéines et soulevant l'existence probable de réseaux complexes de régulation par les ARNnc chez les mammifères.

I.6. La transcription est liée au positionnement des gènes au sein d'un noyau hautement structuré

Nous avons pu voir au sein des paragraphes précédents plusieurs exemples illustrant que le noyau n'est pas simplement un sac contenant les chromosomes mais une structure hautement organisée. Le positionnement des gènes au sein de cette organisation est un déterminant majeur de leur activité transcriptionnelle (figure 9).

Tout d'abord, le positionnement des chromosomes dans le noyau n'est pas aléatoire : chacun occupe un territoire distinct (territoire chromosomique : TC) bien que 20% du volume nucléaire soit occupé par des chromosomes voisins entremêlés (Cremer and Cremer, 2010). Ce positionnement va dépendre du type cellulaire. Ainsi, dans les lymphocytes, les chromosomes riches en gènes seront situés au centre et les chromosomes contenant relativement moins de gènes à la périphérie (Branco et al., 2008). Dans les fibroblastes, c'est la taille des chromosomes qui détermine leur position, les plus petits occupant l'espace nucléaire central et les plus grands se trouvant à la périphérie (Bolzer et al., 2005). L'activation de la transcription des gènes va s'accompagner, certaines fois au moins, de l'extrusion du gène et de ses séquences régulatrices hors du TC, parfois pour rejoindre un autre TC. C'est le cas par exemple



Current Opinion in Cell Biology

Figure 9. **Organisation nucléaire et transcription**

a: Le noyau est composé de membranes internes et externes ponctuées de pores nucléaires (structures en corbeille). La lamine établit un maillage sur la partie interne de l'enveloppe nucléaire (motif en treillis). Au sein du noyau, les chromosomes (lignes épaisses colorées) occupent des territoires spécifiques (zones colorées correspondantes). L'hétérochromatine occupe principalement la périphérie nucléaire (zones plus sombres au sein des territoires chromosomiques (TC)). Les gènes activés transcriptionnellement s'extrudent en dehors des TC et viennent rejoindre les régions inter-chromosomiques (zones blanches) enrichies en compartiments nucléaires contenant des facteurs de transcription (jaune), des facteurs d'épissage (violet), des protéines Polycomb (rouge sombre) et des Pol II (gris).

b: des protéines (ovales gris et rond jaune) attachent les chromosomes à la périphérie nucléaire et répriment les gènes voisins (flèche coudée barrée).

c: Les gènes actifs (flèches coudées) sont recrutés au niveau d'usines à transcription au sein d'espaces inter-chromosomiques enrichis en Pol II (ovale grise), TFs (jaune), facteurs d'épissage (cercles bleus) et transcrits d'ARN (lignes violettes).

d: les protéines Polycomb liées à des sites distincts dispersés dans le génome se regroupent pour former des corps Polycomb (cercles rouge sombre).

D'après Geyer, 2011.

pour le gène de la globine β dont l'expression à fort niveau est précédée de son extrusion qui nécessite la présence de ses séquences *cis*-régulatrices (Ragoczy et al., 2003). L'enhancer responsable de l'expression dans le bourgeon caudal du gène *Shh* est également nécessaire à son extrusion hors de son TC (Amano et al., 2009) tandis que l'insertion transgénique du locus *Hoxb1* à l'extrémité 5' du cluster *Hoxd*, normalement transcriptionnellement inactif dans le système d'étude, va entraîner l'extrusion locale de cette région ainsi que la décondensation de la chromatine (Morey et al., 2008). Confortant ces données, l'induction de l'expression de *Hoxb1* en culture cellulaire par l'acide rétinoïque s'accompagne de la réorganisation de la chromatine du complexe *Hoxb* et de l'extrusion de son locus du TC (Chambeyron and Bickmore, 2004). Cette réorganisation est également observée suite au démarrage l'expression de ce gène dans le rhombencéphale au cours du développement (Chambeyron et al., 2005).

Ensuite, dans de nombreux types cellulaires métazoaires, les gènes transcriptionnellement actifs apparaissent localisés à l'intérieur du noyau tandis que les gènes réprimés sont trouvés à la périphérie, souvent associés à la lamine. L'attachement artificiel d'un chromosome à la lamine nucléaire entraîne d'ailleurs l'inactivation d'une partie des gènes de ce chromosome (Finlan et al., 2008). Là encore, l'étude du locus de la globine β suggère une implication des séquences *cis*-régulatrices : au cours de la différenciation cellulaires des érythrocytes, le locus de la globine β migre depuis la périphérie jusqu'au centre du noyau, ce qui s'accompagne de l'accroissement de sa transcription tandis que la délétion des séquences *cis*-régulatrices du locus abolit cette migration (Ragoczy et al., 2006).

Enfin, le noyau contient de nombreuses sous-structures organisées susceptibles de moduler l'expression des gènes situés à proximité (Ferrai et al., 2010) telles que le nucléole, les corps de Cajal, les corps PML, les gouttes d'épissage (« splicing speckles »), etc... Les gouttes d'épissage par exemple sont impliquées dans la maturation de l'ARN mais pourraient servir de support pour la co-localisation de gènes éloignés ou sur des chromosomes différents comme observé pour les gènes spécifiques des érythrocytes (Brown et al., 2008). Les sous-structures les plus étudiées sont les corps de répression Polycomb et les usines à transcription dont nous avons déjà discutés. Les usines à transcription diffèrent selon les FTs impliqués dans la transcription, rappelant le rôle central de ces acteurs dans les différents niveaux de régulation de la transcription. La nature discrète de ces différents compartiments ne contribue pas seulement au

partitionnement physique de l'espace nucléaire mais crée également des domaines fonctionnels distincts au sein du noyau. Les mécanismes par lesquels le positionnement spatial du génome contribue à la régulation fonctionnelle de la transcription sont cependant loin d'être compris et constituent un des plus grands enjeux de la génétique et de la biologie moléculaire moderne.

1.7. Découvertes récentes : Pol II en pause et « shadow » enhancers

Au cours des opus précédents, nous avons pu voir que la régulation transcriptionnelle est un processus hautement complexe dont des composantes nouvelles sont mises en lumière régulièrement. La dernière partie de ce chapitre traite de deux propriétés récemment découvertes et semblant être principalement associées aux gènes du développement : les Pol II en pause et les « shadow » enhancers.

1.7.a) Les Pol II en pause (« paused Polymerase ») prépareraient les gènes à la transcription

Des études sur génome entier chez l'embryon de drosophile ou des cellules souches embryonnaires humaines ont montré qu'un nombre important – entre 10 et 30% – des gènes inactifs étaient pourtant liés à la Pol II au niveau de leurs régions promotrices (Guenther et al., 2007; Zeitlinger et al., 2007; Levine, 2011). Ces gènes sont la plupart du temps dans un état bivalent possédant à la fois des marques d'histone activatrices et répressives et ce sont souvent des gènes du développement. Au moins la moitié des gènes du développement non exprimés chez la drosophile se trouveraient dans cette configuration où la Pol II est liée mais la transcription est arrêtée.

Au niveau de ces gènes, le PIC a été assemblé au niveau des régions promotrices et la Pol II a été activée par la phosphorylation de certains de ses résidus, notamment la sérine en position 5. La Pol II a démarré la transcription puis s'est stoppée après avoir transcrit les 30-50 premiers nucléotides. La Pol II est alors dite en pause (« paused » ou « stalled polymerase ») et la transcription est alors régulée non plus par l'assemblage du PIC mais par le redémarrage de l'élongation.

Les mécanismes régulant la mise en pause de la Pol II sont mal connus, tout comme ceux gouvernant la reprise de la transcription. Des séquences situées dans les régions promotrices semblent être impliquées, en particulier le DPE ainsi que des motifs spécialisés comme le PB (« paused button ») ou la séquence GAGA (Hendrix et al., 2008). Les promoteurs de nombreux gènes en pause sont enrichis en GC, ce qui oppose peut-être une barrière énergétique à l'ouverture de l'hélice de l'ADN et entraîne l'arrêt de la transcription. Des FTs spécifiques, comme le facteur Zelda impliqué dans la transition maternelle/zygotique (Liang et al., 2008), sont également susceptibles de contribuer à la mise en pause de la Pol II. La reprise de l'élongation est induite par la phosphorylation de la sérine en position 2 sur la Pol II par le facteur d'élongation de la transcription P-TEFb (« Positive Transcription Elongation Factor b »).

Pourquoi un nombre aussi important de gènes contient-il des Pol II en pause ? Il est proposé que cela puisse permettre au gène d'être induit rapidement et efficacement. La Pol II en pause servirait donc à préparer le gène à être transcrit en modifiant son environnement chromatinien, la Pol II contenant des activités intrinsèques de décondensation de la chromatine et de déplacement des nucléosomes (Timmers and Tora, 2005; Gilchrist et al., 2010). Une autre hypothèse est que les Pol II en pause permettraient une activation coordonnée du gène dans plusieurs cellules en s'affranchissant de la nature stochastique du recrutement de la Pol II (Boettiger and Levine, 2009). La vitesse et la coordination d'induction de la transcription sont des caractéristiques communes à de nombreux gènes du développement, il ne serait donc pas surprenant que les Pol II en pause, présentes principalement chez ces gènes, favorisent des deux propriétés.

1.7.b) Les « shadow » enhancers ou « enhancers distribués » conféreraient de la robustesse et de la précision d'expression

Beaucoup de gènes possèdent plusieurs séquences cis-régulatrices contrôlant leur expression. Comme nous l'avons vu, l'information transcriptionnelle est répartie en modules et le plus souvent des enhancers différents vont induire la transcription dans des tissus et des périodes de développement différents. Cependant, dans un certain nombre de cas, plusieurs enhancers régulant le même gène lient les mêmes FTs et possèdent des activités spatio-temporelles similaires et donc a priori redondantes. De

récents travaux (revus ici : Barolo, 2012; Lagha, Bothma, & Levine, 2012) montrent que, pour les enhanceurs étudiés au moins, cette redondance n'est pas fonctionnelle.

Le gène *ATOH7* par exemple est essentiel pour le développement de la rétine chez les mammifères et son expression est contrôlée par deux enhanceurs induisant la même expression sur un gène rapporteur. Pourtant, la délétion de l'enhancer le plus distal entraîne des pathologies de cécité à la naissance (Ghiasvand et al., 2011). Parfois, la délétion d'un des enhanceurs ne résulte en aucun phénotype dans des conditions normales de développement, comme c'est le cas pour l'enhancer proximal du gène *Snail*, impliqué dans le développement de la drosophile (Perry, 2010). En revanche, des conditions dites de stress, comme une élévation de la température ou un background génétique hétérozygote pour le régulateur *Dorsal*, entraînent des défauts de gastrulation dans les embryons où l'enhancer proximal a été excisé. La multiplicité d'enhancers similaires apporterait donc de la robustesse d'expression au gène contrôlé en permettant à celle-ci d'être indépendante des variations environnementales ou alléliques.

Dans des travaux pionniers de 2008 (Hong et al., 2008), Mickael Levine utilise le terme désormais célèbre quoique controversé de « shadow enhancer » pour qualifier ces éléments régulateurs aux profils d'activité redondants. En effet, le plus souvent dans les premiers cas étudiés, un des deux enhanceurs se trouvait dans des régions génomiques relativement éloignées du promoteur, parfois dans les séquences non codantes d'un gène voisin, et était alors qualifié de shadow par opposition au premier enhancer situé à proximité du gène et dont l'identification avait été antérieure et plus aisée. Au fur et à mesure que de nouveaux cas d'enhancers redondants ont été révélés, cette distinction est devenue de plus en plus arbitraire et Scott Barolo propose désormais d'employer l'expression d'« enhanceurs distribués » pour qualifier ces séquences cis-régulatrices.

Les enhanceurs distribués permettraient aussi aux gènes d'être exprimés dans des territoires aux limites précises : ainsi les deux enhanceurs de *Snail* induisent, lorsqu'ils sont seuls, l'expression d'un gène rapporteur dans des territoires dont les limites excèdent légèrement celles du gène endogène (Dunipace, 2011). Elucider les mécanismes par lesquels les enhanceurs distribués contribuent à la robustesse et à la précision d'expression des gènes du développement constitue l'un des champs

d'investigation clé pour avancer dans la compréhension de la régulation transcriptionnelle.

Enfin, la publication très récente (5 Septembre 2012) des résultats du projet ENCODE offre l'opportunité de conclure ce chapitre sur une perspective particulièrement excitante pour la régulation transcriptionnelle, dont l'étude initiée il y a plus de 30 ans semble au commencement d'un formidable changement d'échelle. Le projet ENCODE (ENCyclopedia of DNA Elements) a été lancé après la complétion du séquençage du génome humain par l'institut national américain de recherche sur le génome humain (NHGRI) et vise à la caractérisation des éléments fonctionnels de l'intégralité du génome humain. Ses résultats, publiés à travers 30 articles parus dans les revues *Nature*, *Genome Biology* et *Genome Research*, sont saisissants et associent une fonction biochimique à 80% du génome, incluant donc un nombre important de régions non codantes (Dunham et al., 2012), à travers l'utilisation d'un panel de 1640 jeux de données (ChIP-Seq, 3C, hypersensibilité à la DNase, RNA-Seq...). Ils superposent des cartes génomiques de méthylation de l'ADN, de la structure chromatinienne divisée en 7 états, de l'hypersensibilité à la DNase, des régions transcrites, des régions codantes et des sites de fixation par les FTs (8,4 millions de sites répertoriés). Ils incluent également des données d'évolution et d'interactions physiques entre les différentes parties du génome et constituent un formidable outil susceptible d'accélérer considérablement le travail des généticiens et d'en modifier la nature.

II. Développement du système nerveux central des vertébrés

Le système d'étude utilisé au cours des travaux présentés dans ce manuscrit est celui de la segmentation du rhombencéphale au cours du développement des vertébrés. Le rhombencéphale désigne le cerveau postérieur et regroupe, chez l'adulte, le cervelet, le pons et le bulbe rachidien qui vont assurer ensemble la plus grande partie des processus vitaux inconscients de l'organisme. Le bulbe rachidien est lié à la moelle épinière et est le siège de centres de relais qui contrôlent la respiration, la déglutition, la circulation sanguine, la digestion et le tonus musculaire. Le pons connecte le cervelet au tronc cérébral. Il reçoit des informations depuis les aires visuelles et participe à la gestion des mouvements oculaires et du corps. Il joue également un rôle dans la régulation du sommeil et l'éveil. L'information est ensuite relayée jusqu'au cervelet pour contrôler la coordination des mouvements musculaires et assurer l'équilibre. Le cervelet est également impliqué dans l'apprentissage des mouvements.

Toutes ces fonctions sont assurées par la présence de populations neuronales spécifiques et organisées de façon stéréotypée. En particulier, les nerfs crâniens V à XII émergent du rhombencéphale et innervent les muscles de la tête et du cou. Ils vont relayer les injonctions motrices du rhombencéphale et les informations somatosensorielles de la face ainsi que l'information auditive. La mise en place de ces différentes populations cellulaires est conditionnée par le développement du rhombencéphale et par le processus de compartimentation dont il est le siège. Dans cette partie, les différentes étapes développementales conduisant à la formation du rhombencéphale seront décrites tandis que les mécanismes moléculaires à l'origine du processus de segmentation seront détaillés dans l'opus suivant.

II.1. Morphogénèse du système nerveux central

Chez les vertébrés, après les deux premières étapes du développement que sont la fertilisation et le clivage, l'embryon va connaître un processus de gastrulation qui

marque le début de sa morphogénèse et va aboutir, par migration cellulaire, à la mise en place des tissus fondamentaux en feuillet : l'endoderme feuillet interne, le mésoderme feuillet intermédiaire et l'ectoderme feuillet externe à l'origine de l'épiderme et du système nerveux.

Au cours de la gastrulation, une partie des cellules de l'ectoderme dorsal va être induite à se différencier en tissu nerveux. Ces cellules s'allongent et forment une structure épithéliale épaissie appelée plaque neurale, distincte de l'ectoderme adjacent dont les cellules s'aplatissent (figure 10a). L'apparition de la plaque neurale marque le début de la neurulation au cours de laquelle se met en place le système nerveux. Celle-ci va se caractériser par des mouvements morphogénétiques qui vont se creuser la plaque neurale en une gouttière tandis que ses bords s'épaississent et se soulèvent pour former des repliements appelés bourrelets neuraux. L'enroulement progressif de la plaque neurale le long de l'axe antéro-postérieur (AP) conduit à la fusion des bourrelets et à la formation du tube neural qui se sépare de l'épiderme présomptif sus-jacent (figure 10a).

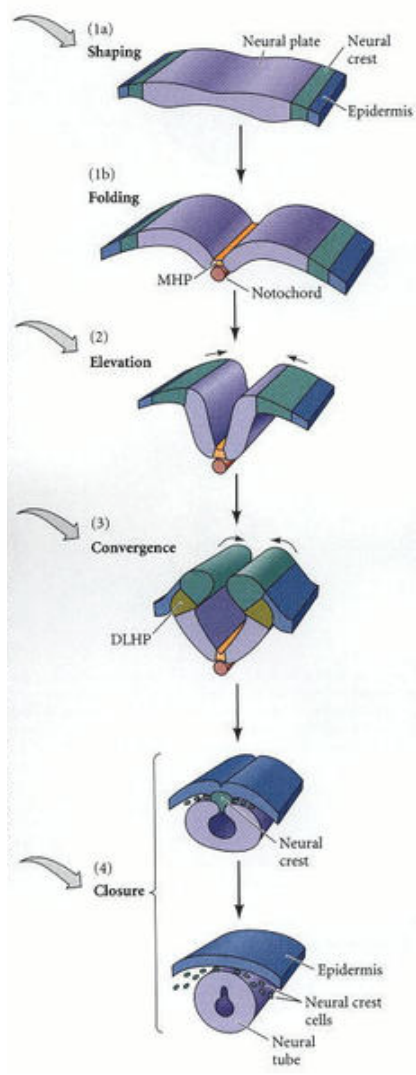
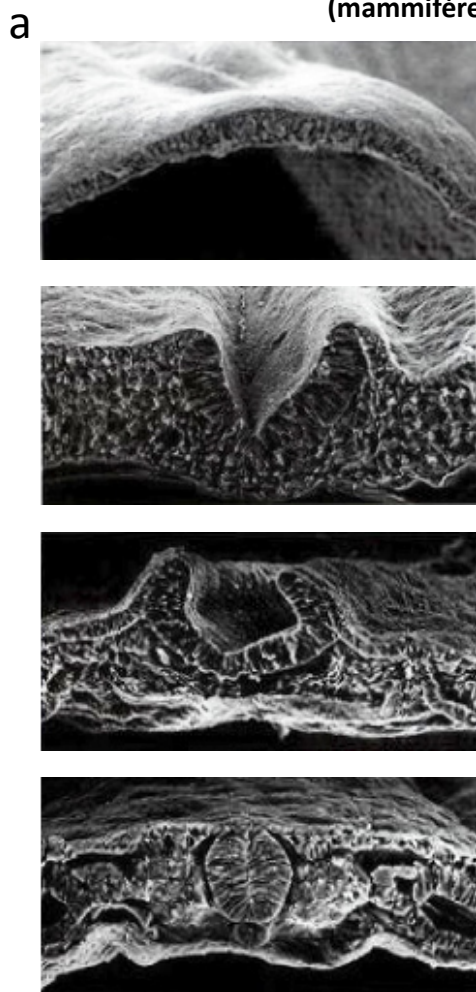
L'invagination de la plaque neurale est le principal processus de formation du tube neural chez les oiseaux et les mammifères, il est appelé neurulation primaire. Le tube neural peut également se former selon un mécanisme de neurulation secondaire, prédominant chez les téléostéens et dans la partie terminale de la moelle épinière des oiseaux et mammifères, au cours duquel des cellules mésenchymateuses s'agrègent en une tige. Les cellules de la tige subissent ensuite un processus de transition épithéliale avant qu'une lumière se creuse au sein de la tige (figure 10b).

Peu après la formation du tube neural, des cellules situées dans la partie dorsale vont se désolidariser du tube et donner naissance à la crête neurale. Les cellules de la crête neurale migrent dans tout l'embryon et sont à l'origine du système nerveux périphérique, des mélanocytes et d'une grande partie des os et des cartilages de la face.

Après sa formation ou concurremment à celle-ci suivant les régions, le tube neural va se différencier le long de l'axe AP. Les premiers signes morphologiques de cette régionalisation apparaissent à la fermeture du tube neural rostral avec la formation de trois vésicules dans la partie antérieure (figure 11) : le cerveau antérieur (prosencephale), le cerveau moyen (mésencéphale) et le cerveau postérieur (rhombencéphale).

Rapidement, dès la fermeture du tube neural caudal, ces 3 vésicules primaires vont se fractionner en 5 vésicules secondaires. Le prosencephale se subdivise

Neurulation primaire (mammifères, oiseaux)



Neurulation secondaire (poissons)

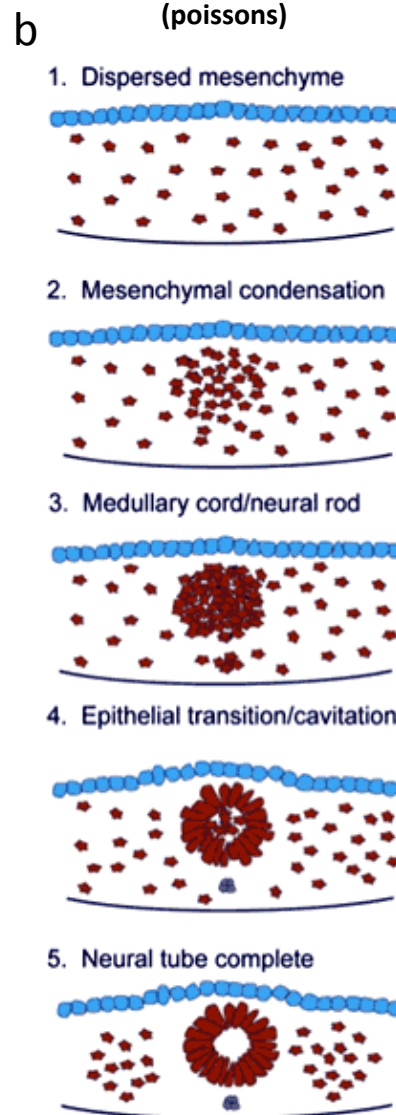


Figure 10. Formation du tube neural

a: clichés de microscopie électronique (gauche) et schéma (droite) des différentes étapes de neurulation primaire (chez le poulet). 1a: Les cellules de la plaque neurale (bleu clair) peuvent être distinguées par leur forme allongée dans la partie dorsale de l'ectoderme. 1b: l'invagination de la plaque neurale commence lorsque les cellules de la charnière médiane (jaune, MHP : Medial Hinge Point) s'attachent à la notochorde (marron) et modifient leurs formes et leurs propriétés mécaniques et adhésives. 2: les bourrelets neuraux s'élèvent à mesure que l'épiderme présomptif (bleu foncé) de part et d'autre de la plaque neurale converge vers le centre. 3: les bords de la gouttière neurale se rejoignent lorsque, similairement à la MHP, les cellules des charnières dorso-latérales (marron-vert, DLHP : Dorso-Lateral Hinge Point) changent de forme à leur tour. 4: le tube neural se ferme quand les bourrelets neuraux entrent en contact. Les cellules de la crête neurale (vert), à la jonction entre la partie dorsale du tube neural et l'épiderme sus-jacent, se séparent de ces deux structures pour migrer dans tout l'embryon.

D'après Gilbert, 2000; et Smith and Schoenwolf, 1997.

b: la neurulation secondaire, prédominante chez les téléostéens et dans la partie caudale du tube neural des oiseaux et mammifères, est caractérisée par l'agrégation de cellules mésenchymateuses (2) qui forment une tige (3). Ces cellules subissent ensuite un processus de transition épithéliale tandis qu'une lumière se creuse au sein de la tige (4) pour former le tube neural (5). D'après Lowery et Sive, 2004.

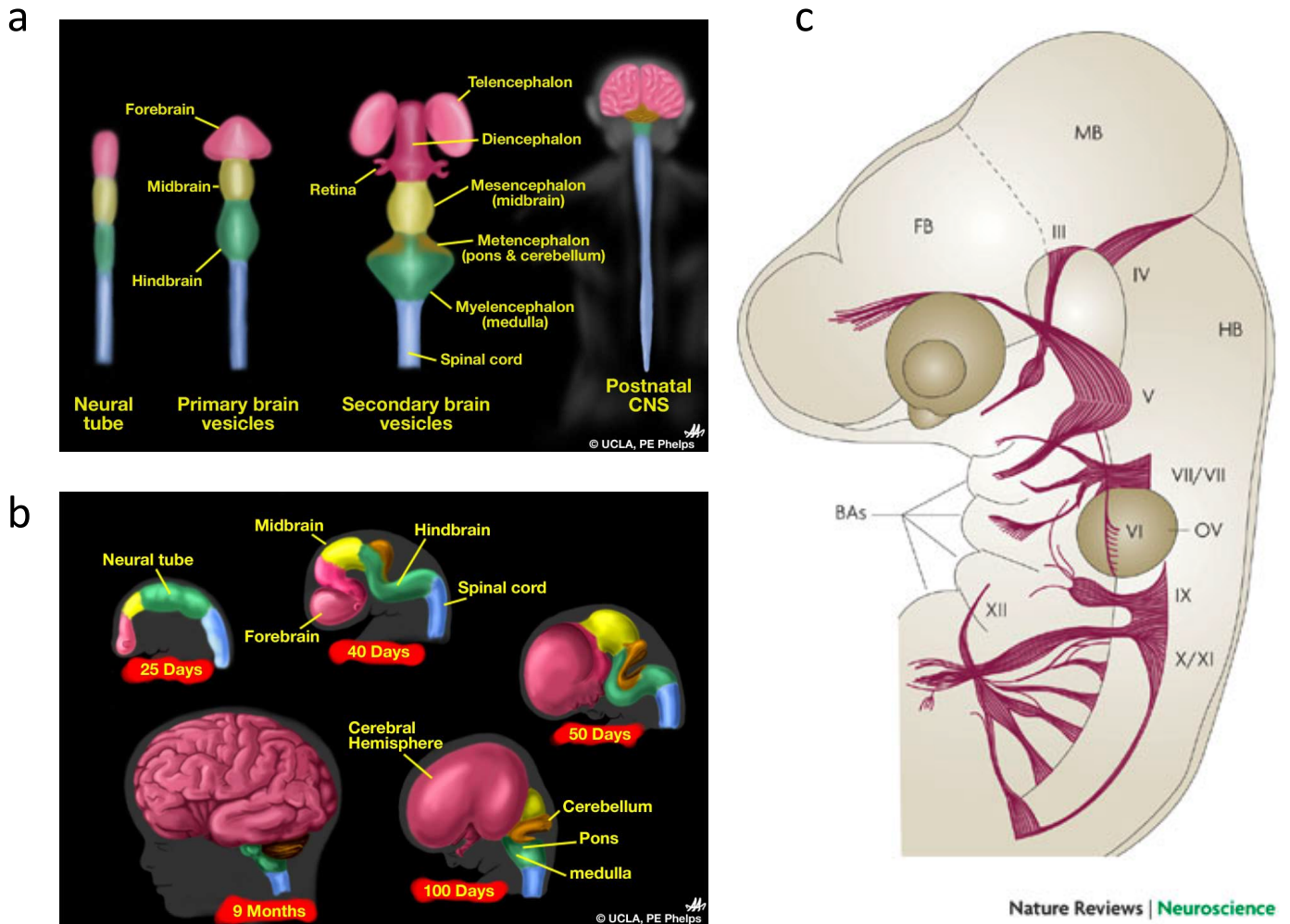


Figure 11. Etapes de régionalisation AP du cerveau chez les vertébrés

a: la partie antérieure du tube neural est le siège de la formation des trois vésicules primaires: prosencéphale (rose), mésencéphale (jaune) et rhombencéphale (vert). Ces structures se subdivisent ensuite pour donner le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale. La partie postérieure du tube forme la moelle épinière. Toutes ces structures constitueront le système nerveux adulte. (CNS: Système Nerveux Central). D'après UCLA, physiological sciences 107.

b: vue latérale du devenir des différentes vésicules céphaliques au cours du développement du cerveau humain. D'après UCLA, physiological sciences 107.

c: vue latérale d'un embryon de poulet à 4 jours de développement figurant les différentes parties du cerveau et les nerfs crâniens III à XII. BAs : Arcs Branchiaux, FB : ForeBrain (prosencéphale), HB : HindBrain (rhombencéphale), MB : MidBrain (mésencéphale), OV : Vésicule Otique. D'après Guthrie, 2007.

antérieurement en télencéphale qui donnera naissance aux hémisphères cérébraux, à l'hippocampe, aux bulbes olfactifs, et aux ganglions de la base, et postérieurement en diencéphale caractérisé par la présence des vésicules optiques et qui forme les diverses structures thalamiques recevant l'information de la rétine. Le cerveau moyen ne se subdivise pas et est à l'origine du tectum et du tegmentum ainsi qu'une partie du cervelet. Enfin, le rhombencéphale se sépare antérieurement en métencéphale et postérieurement en myélocéphale. Le métencéphale participera à la formation du cervelet et du pons tandis que le myélocéphale donnera naissance au bulbe rachidien. Postérieurement, le tube neural deviendra la moelle épinière. La taille relative des différentes vésicules et des structures qui en dérivent varie énormément au sein des différents groupes de vertébrés. Le diencéphale est par exemple très développé chez les amphibiens tandis que les mammifères présentent un télencéphale plus imposant.

II.2. L'induction neurale

II.2.a) L'organisateur de Spemann

L'induction neurale désigne le processus qui commande à une partie des cellules de l'épiderme dorsal de se différencier en cellules neurales et de former la plaque neurale. Cette induction résulte de l'effet de signaux émis par les tissus adjacents, notamment par un groupe de cellules du mésoderme dorsal collectivement appelées « organisateur de Spemann ». La démonstration dans les années 1920 du rôle inducteur des cellules de l'organisateur de Spemann constitue l'une des expériences les plus spectaculaires de la biologie du développement (Spemann and Mangold, 2001). Elle repose sur le prélèvement de cellules mésodermiques au niveau de la lèvre dorsale du blastopore de triton et à leur transplantation dans l'ectoderme ventral d'embryons au même stade (figure 12). Cette greffe conduit à l'induction d'un second axe embryonnaire complet. Des expériences de traçages ont montré que la majorité du système nerveux de l'embryon surnuméraire provenait du recrutement de cellules de l'ectoderme ventral de l'embryon hôte, le tissu transplanté ne contribuant qu'à la notochorde, aux somites et à la partie la plus axiale du neuroectoderme, le plancher du tube neural (Gimlich & Cooke, 1983). Ainsi, l'organisateur de Spemann est capable d'induire les régions auprès desquelles il est transplanté à devenir du tissu neural et de générer une organisation

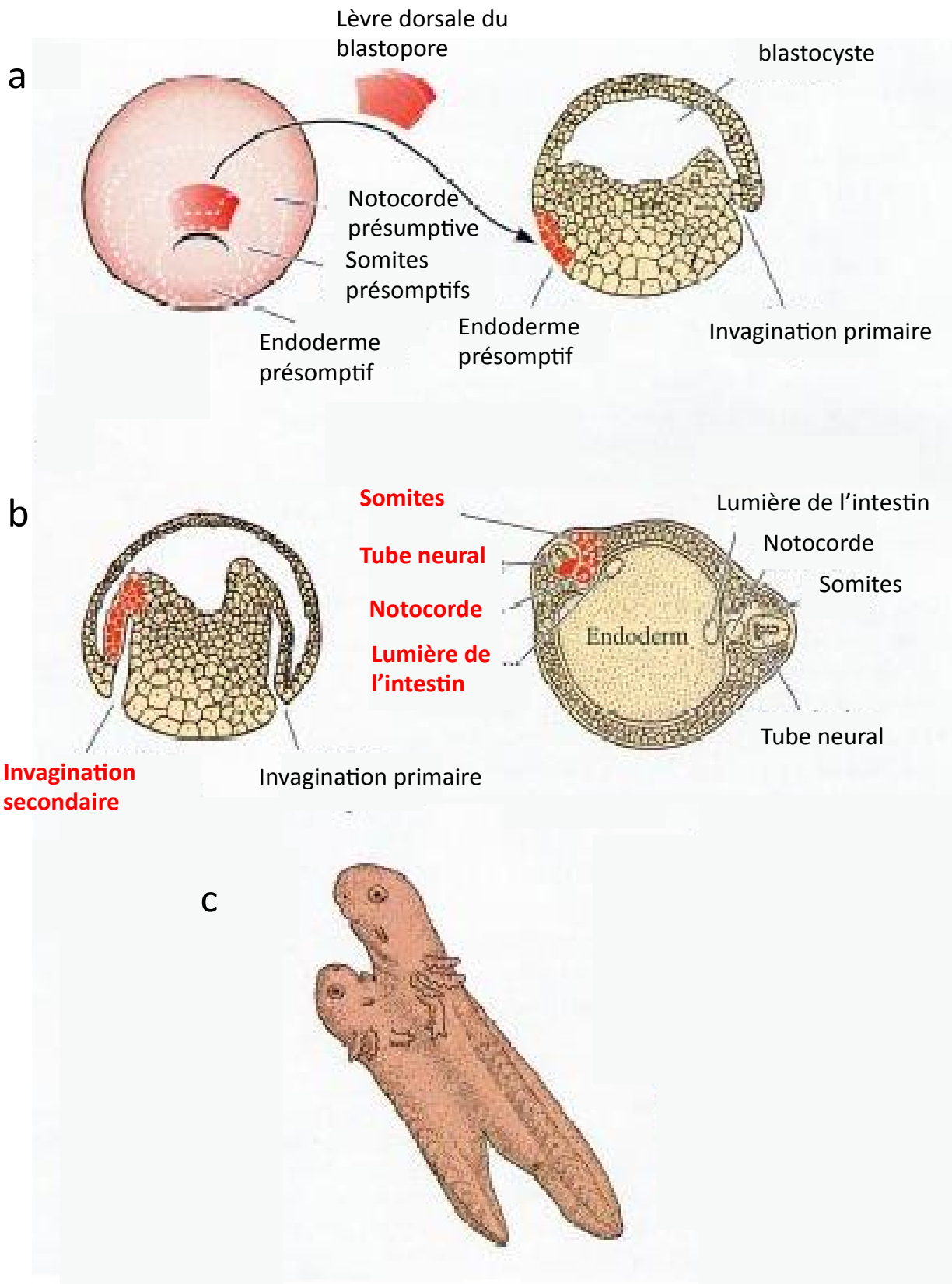


Figure 12. **Expérience de Spemann et Mangold: découverte de l'organisateur de Spemann**

a: la lèvre dorsale du blastopore d'une jeune gastrula de triton est transplantée dans l'épiderme ventral d'un second embryon du même âge.

b: le tissu greffé s'invagine et induit la formation d'un second axe complet constitué de tissus de l'hôte et du greffon (en rouge).

c: la transplantation a provoqué l'induction d'un second axe embryonnaire complet et le développement de têtards « siamois ».

D'après Gilbert, 2000.

cohérente de ce tissu. Strictement, l'organisateur de Spemann désigne la région organisatrice du blastopore amphibien, puisque c'est chez le triton qu'il a été caractérisé pour la première fois. Des équivalents fonctionnels ont été identifiés chez les autres groupes de vertébrés : il s'agit du bouclier chez les téléostéens et du nœud de Hansen chez les amniotes (Beddington, 1994; Shih & Fraser, 1996; Waddington, 1950).

II.2.b) Les voies de signalisation instruisant l'induction

La capacité de l'organisateur à modifier le destin de cellules voisines suggère l'existence de molécules diffusibles produites par l'organisateur et relayant ses instructions. L'identification des facteurs chordin, noggin et follistatin exprimés dans l'organisateur de Spemann et antagonistes des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) a permis l'établissement d'un premier modèle d'identité neurale « par défaut ».

En effet, si des cellules de l'ectoderme dorsal de xénope prélevées au stade blastula sont cultivées *in vitro*, elles se différencieront en épiderme. Mais si ces cellules sont préalablement dissociées, elles acquerront une identité neurale. Cela suggère que les cellules de l'ectoderme ont une tendance autonome à développer une identité neuronale par défaut et que cette tendance est inhibée par des signaux diffusibles qui dirigent les cellules vers un destin épidermique. Ce sont les BMPs, exprimés dans tout l'ectoderme précoce, qui jouent ce rôle d'inhibiteur de différenciation neurale. Ainsi, l'incubation de cellules ectodermales dissociées avec le facteur BMP4 réprime la différenciation neuronale et induit la transformation en épiderme (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995).

Dans la gastrula, l'organisateur promeut la différenciation en tissu neural en sécrétant les facteurs chordin, noggin et follistatin qui antagonisent les BMPs et inactivent leurs fonctions inhibitrices (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994). Les facteurs noggin et chordin se lient avec une forte affinité aux BMPs ou à leurs récepteurs (Hansen et al., 1997; Piccolo et al., 1996) tandis que la follistatin peut lier les deux molécules simultanément et former des complexes trimériques inactifs (Iemura et al., 1998).

Bien que l'importance du modèle par défaut soit largement reconnue, il ne suffit pas à expliquer seul le processus d'induction neurale. En particulier, l'ablation génétique ou chirurgicale de l'organisateur chez la souris ou le poisson-zèbre n'empêche pas la plaque neurale de se former (Klingensmith et al., 1999; Shih & Fraser, 1996). Cela

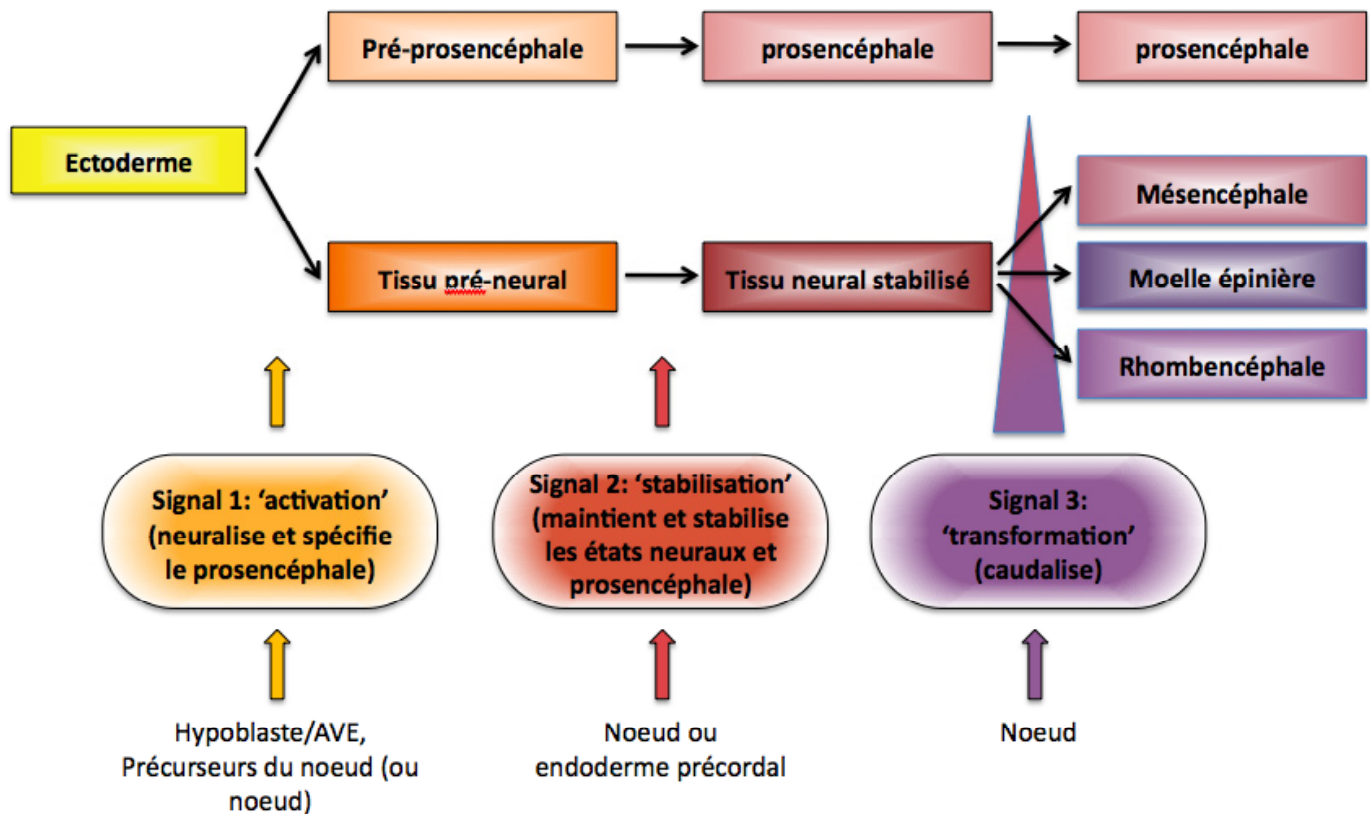


Figure 13. **Modèle d'activation-transformation de Nieuwkoop complété par Stern**

Le modèle propose que l'induction neurale et la régionalisation AP se produisent en deux étapes requérant trois types de signaux. L'induction neurale a lieu au cours d'une première étape d'« activation », peu avant la gastrulation, pendant laquelle l'hypoblaste chez le poulet ou l'AVE chez la souris, peut-être en combinaison avec les précurseurs de l'organisateur (noeud de Hansen chez les mammifères), promeuvent un état pré-neural et une identité antérieure. Pour conserver un destin neural, les cellules doivent également recevoir des signaux stabilisateurs en provenance de l'organisateur et/ou de ses descendants (mésendoderme précordal). Ensuite, les régions situées à proximité de l'organisateur vont être progressivement « transformées » en structures postérieures à mesure qu'elles sont soumises à des intensités croissantes de facteurs caudalisants, quantitativement ou temporellement.

AVE : Anterior Visceral Endoderm

Modifié de Stern, 2001.

suggère que l'induction neurale précède la formation de l'organisateur et que des signaux autres que les inhibiteurs aux BMPs sont également impliqués. Un ensemble d'études (revu ici : Stern, 2005; Leclerc et al., 2011) montre que les FGFs (Fibroblast Growth Factors) sont aussi nécessaires à l'induction neurale. Par exemple, l'inactivation de la signalisation FGF par l'injection d'une version dominante négative d'un récepteur dans un embryon amphibien bloque l'induction neurale (Launay et al., 1996; Sasai et al., 1996). À l'inverse, la co-injection dans des blastomères d'inhibiteurs des BMPs et d'ARNm FGF4 induit les cellules de la partie ventrale à adopter une identité neurale, ce qui n'est pas observé lorsque seuls les inhibiteurs des BMPs sont injectés (Linker and Stern, 2004; Delaune et al., 2005). La concentration locale en ion calcium semble également jouer un rôle important pour l'induction neurale (Moreau et al., 2008).

Ces différentes voies de signalisation présentent des régulations croisées (figure 14a) et l'information qu'elles portent est intégrée au niveau de la régulation des FTs *Zic1* et *Zic3*, qui semblent être les principaux effecteurs de la différenciation neurale en activant l'expression du marqueur neural terminal *Sox2* (Marchal et al., 2009).

II.3. Régionalisation du tube neural

La mise en place des différentes structures nerveuses au niveau du neuroectoderme nouvellement induit implique l'acquisition d'une identité positionnelle AP et dorso-ventrale. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux mécanismes impliqués dans l'identité AP.

II.3.a) Le modèle « activation-transformation » de Nieuwkoop

Le principal modèle considéré pour rendre compte de la régionalisation AP de la plaque neurale est celui de Nieuwkoop, revisité en 2001 par Stern (figure 13, Nieuwkoop, 1952; Stern, 2001). Selon ce modèle, l'induction neurale décrite précédemment permet l'acquisition d'une identité neurale antérieure au cours d'une première étape dite d'« activation ». Le maintien de cette identité va nécessiter l'action d'un signal stabilisateur en provenance de l'organisateur et de ses dérivés mésodermaux. Puis, au cours d'une seconde étape dite de « transformation », la plaque

neurale stabilisée est soumise à l'action de facteurs caudalisants produits par l'organisateur et qui promeuvent l'acquisition d'une identité postérieure. La partie la plus antérieure de la plaque neurale est protégée de l'activité transformante de ces signaux par l'endoderme viscéral antérieur (AVE), un groupe de cellules situées antérieurement à l'organisateur qui va sécréter des antagonistes aux facteurs caudalisants et promouvoir des mouvements morphogénétiques déplaçant la partie antérieure de la plaque neurale loin de l'organisateur.

II.3.b) Les acteurs moléculaires de la transformation: Wnt, AR et FGF (figure 14b)

Les acteurs de la voie de signalisation Wnt, exprimés précocement dans les régions postérieures de l'embryon, jouent un rôle majeur dans la spécification des identités caudales (diencephale, mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière). Par exemple, la surexpression de *Wnt3a* chez le xénope réprime l'expression de marqueurs antérieurs et active celle des marqueurs postérieurs (McGrew et al., 1995). À l'inverse, en présence d'inhibiteurs de cette voie seuls des marqueurs du télencéphale sont induits (Nordström et al., 2002, 2006). Les protéines Wnt constituent vraisemblablement le signal effecteur responsable de l'activité caudalisante du mésoderme paraxial qui est capable de conférer une identité postérieure à la plaque neurale sus-jacente (Muhr et al., 1997, 1999). En effet, les protéines Wnt issues du mésoderme paraxial induisent l'expression d'autres gènes *Wnt* dans la plaque neurale. La spécification caudale par les Wnt est instructive : sur des cultures d'embryons *in vitro*, des quantités croissantes de Wnt confèrent aux cellules neurales une identité de plus en plus postérieure. L'AVE protège la partie antérieure du tube neural de cette activité caudalisante en sécrétant des facteurs antagonistes impliquant le gène *Otx2* (Perea-Gomez et al., 2001). La transformation par les Wnt nécessite la présence des FGF.

L'acide rétinoïque (AR) est également très largement impliqué dans la caudalisation de la plaque neurale. C'est une petite molécule diffusible synthétisée au niveau du mésoderme paraxial par l'enzyme RALDH2 et dont la présence est finement régulée par les enzymes de dégradation CYP26 exprimées dans la plaque neurale (Reijntjes et al., 2005). La répartition et l'activité de ces deux enzymes établiraient un gradient AP de distribution de l'AR dans la plaque neurale permettant une postériorisation progressive du tissu neural (Glover et al., 2006). L'augmentation ou la diminution exogène du niveau d'AR dans l'embryon corrèle respectivement avec une

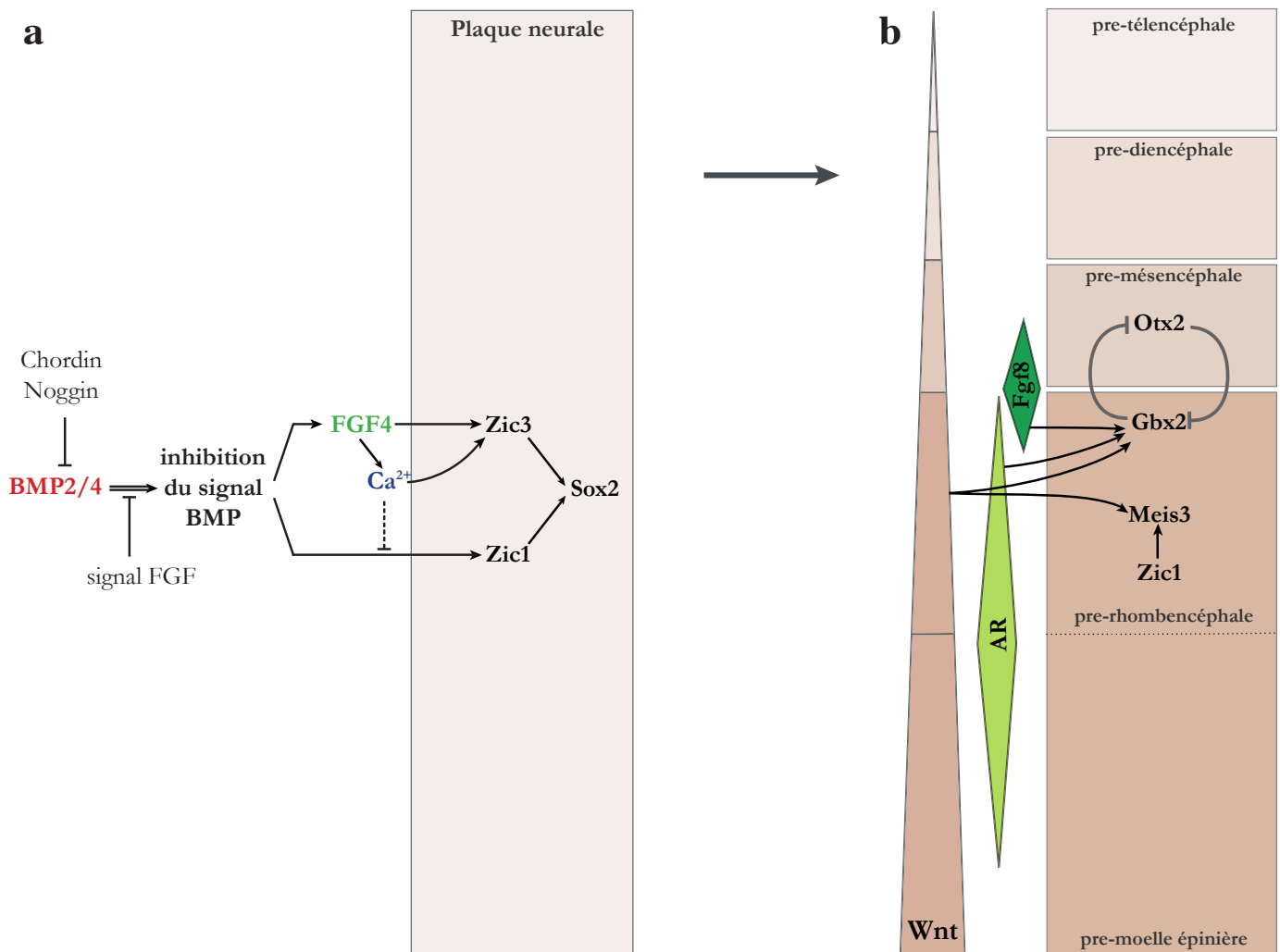


Figure 14. Principaux acteurs de l'induction neurale et de la régionalisation AP précoce du système nerveux

a: L'inhibition de la voie BMP, la signalisation FGF et la modulation de la concentration locale en calcium vont induire la formation de la plaque neurale en activant l'expression des facteurs *Zic1* et *Zic3* et du marqueur neural final *Sox2*.

Modifié de Aruga et Mikoshiba, 2011.

b: les Wnt transforment ensuite le territoire neural en induisant des destins de plus en plus postérieurs. La définition et le maintien du rhombencéphale requièrent de plus l'action concertée des FGF et l'AR.

Extrait du manuscrit de thèse de Y. Bouchoucha, 2012.

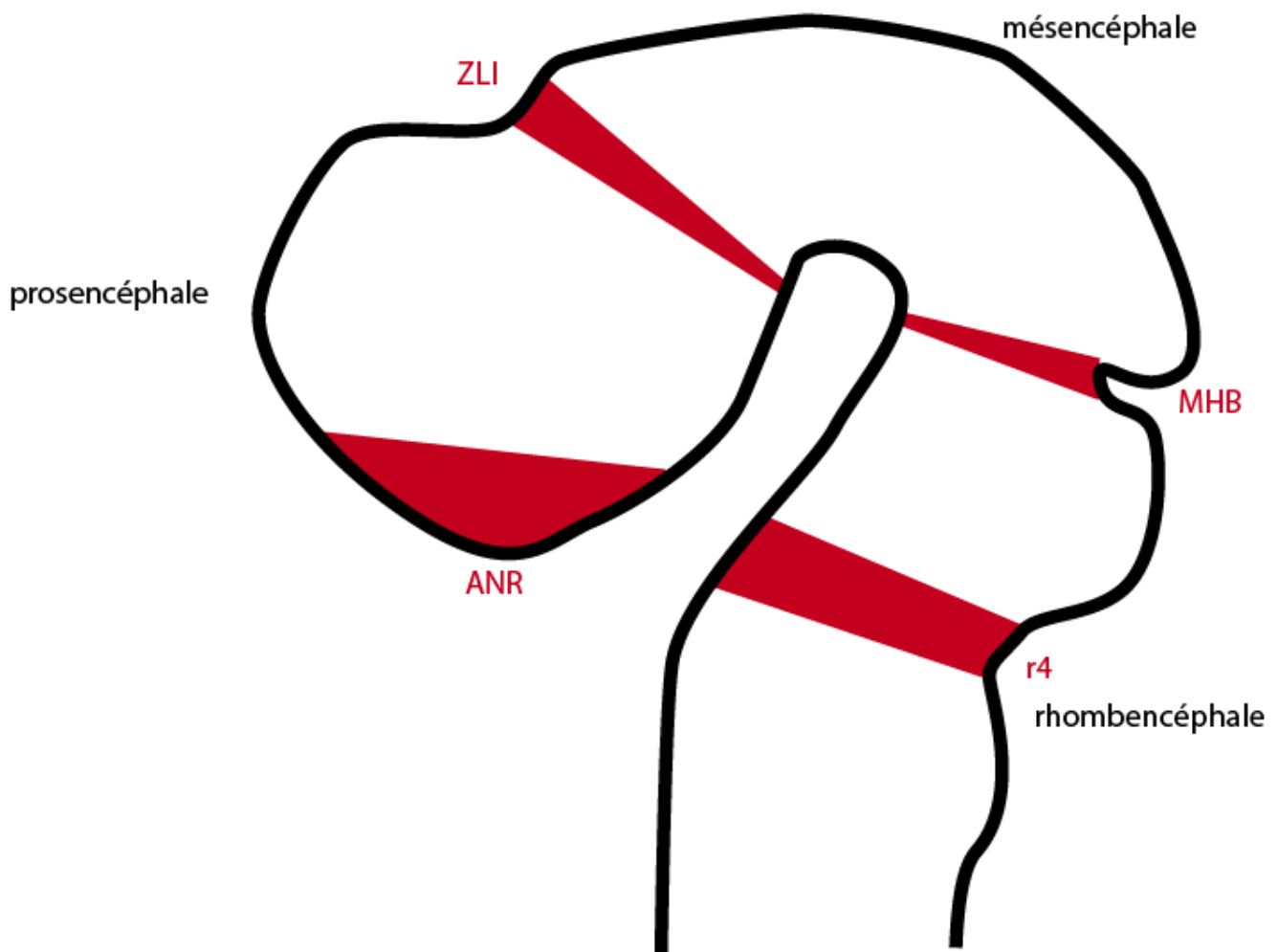


Figure 15. Centres organisateurs secondaires dans le tube neural

Représentation schématique dans un embryon de souris à 9,5 jpc des différents centres organisateurs secondaires intervenant dans la régionalisation AP du tube neural: l'ANR (Anterior Neural Ridge), la ZLI (Zona Limitans Intrathalamica), la MHB (Midbrain Hindbrain Boundary également appelée organisateur isthmique) et le rhombomère 4.

Adapté de Echevarria et al., 2003.

postériorisation des structures antérieures ou la perturbation de la formation du rhombencéphale (Durston et al., 1989; White et al., 2000). Comme nous le verrons plus loin, l'AR, en combinaison avec les FGFs et postérieurement avec les FTs Cdx, induit l'expression de gènes *Hox* spécifiques du rhombencéphale et de la moelle épinière (Bel-Vialar et al., 2002).

Les FGFs, dont nous avons déjà décrit un premier rôle bimodal dans l'induction neurale, interviennent également dans le processus de transformation caudalisante (Dorey and Amaya, 2010). Le plus souvent, les FGFs n'agissent pas seuls mais en coordination avec les autres voies de signalisation. Ils exercent par exemple une activité permissive à la transformation caudale par les Wnts ou modulatrice vis-à-vis de noggin qui promeut l'expression de marqueurs neuraux antérieurs lorsqu'elle est utilisée seule ou postérieurs lorsqu'elle est combinée avec les FGFs (Cox and Hemmati-Brivanlou, 1995).

Plus tardivement, des organisateurs locaux secondaires se mettent en place et affinent le patron AP. Trois régions organisatrices sont communément décrites (figure 15, Echevarría et al., 2003). À l'extrême limite antérieure du tube neural, l'ANR (Anterior Neural Ridge) promeut le développement télencéphalique. Plus postérieurement, la ZLI (Zona Limitans Intrathalamica) sépare les deux sous-compartiments les plus postérieurs du prosencéphale et spécifie leurs propriétés et leur organisation spatiale. Enfin, à la frontière entre le mésencéphale et le rhombencéphale, l'organisateur isthmique (également appelé MHB pour 'Midbrain-Hindbrain Boundary') agit comme une source locale de molécules FGF8 qui permet la régionalisation du mésencéphale d'une part et la spécification du rhombencéphale antérieur d'autre part en y empêchant l'expression des gènes *Hox* (Irving and Mason, 2000). Le sous-compartiment le plus central du rhombencéphale, le rhombomère 4, peut également être considéré comme un organisateur secondaire local (Mason, 2007). En effet, il est le siège de la production de signaux FGF (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002) qui vont être requis pour la formation et la spécification des rhombomères adjacents (Marín and Charnay, 2000; Hernandez et al., 2004a).

II.3.c) Spécification précoce du rhombencéphale et protection par *Gbx2*

Le FT *Meis3* constitue l'un des premiers marqueurs spécifiques du rhombencéphale. Son expression, d'abord étendue au neuroectoderme postérieur, se

restreint au rhombencéphale et à la moelle épinière la plus antérieure à partir du stade neurula (Salzberg et al., 1999). L'inactivation de *Meis3* entraîne l'extension du cerveau antérieur au détriment des structures postérieures mais sans affecter la moelle épinière, suggérant que *Meis3* est requis spécifiquement pour la formation du rhombencéphale (Dibner et al., 2001; Dibner et al., 2004). Inversement, la surexpression ectopique de *Meis3* est suffisante pour provoquer l'extension rostrale du rhombencéphale et la répression du prosencéphale (Salzberg et al., 1999; Vlachakis et al., 2001). *Meis3* se situe en aval de la signalisation Wnt et du facteur *Zic1* (Elkouby et al., 2010a) et la surexpression de *Meis3* restaure le phénotype associé à l'inactivation des gènes *Wnt3a* ou *Zic1* (Elkouby et al., 2012) qui entraîne la suppression du rhombencéphale. *Meis3* enclenche le programme de développement du rhombencéphale en régulant les gènes paralogues des groupes *Hox* 1 à 4 et les facteurs *FGF3* et *FGF8* (Gutkovich et al., 2010; Dibner et al., 2004).

L'une des premières décisions développementales organisant le cerveau des vertébrés est la division de la plaque neurale en deux territoires exclusifs exprimant antérieurement le facteur *Otx2* et postérieurement *Gbx2* et dont la frontière correspond à la future jonction mésencéphale-rhombencéphale (MHB). *Otx2* et *Gbx2* sont deux facteurs à homéodomaine qui se répriment mutuellement et sont indispensables à la spécification des identités des régions dans lesquelles ils sont exprimés. Dans les souris mutantes pour *Gbx2*, le rhombencéphale antérieur est perdu jusqu'au rhombomère 3 (r3) et l'expression d'*Otx2* est étendue caudalement (Wassarman et al., 1997). À l'inverse, la mutation du gène *Otx2* entraîne la perte des régions antérieures du cerveau (Acampora et al., 1995). Ainsi, *Gbx2* est requis pour protéger le rhombencéphale de l'action antériorisante d'*Otx2*. Dans le double mutant *Otx2/Gbx2*, l'expression de *Krox20* dans r3 est rétablie, suggérant que, pour ce rhombomère au moins, le facteur *Gbx2* joue un rôle essentiellement permissif en antagonisant l'action d'*Otx2* (Li and Joyner, 2001). L'expression de *Gbx2* est contrôlée par l'action combinée des Wnt, de *Fgf8* et de l'AR (Liu et al., 1999; Li et al., 2009).

III. Développement du rhombencéphale des vertébrés

Le rhombencéphale est la vésicule céphalique primaire la plus postérieure du tube neural. Chez les vertébrés, son développement met en place un processus de segmentation transitoire au cours duquel le rhombencéphale se subdivise le long de l'axe AP en 7 ou 8 constrictions (selon les espèces). Ces constrictions sont appelées rhombomères (r) et constituent des unités d'expression génétique qui vont sous-tendre l'architecture neuronale du rhombencéphale et les flux de crête neurale (CN). Les rhombomères les plus antérieurs r1 et r2 donneront naissance au métencéphale tandis que le territoire r3-r8 formera le myélencéphale.

Le processus de segmentation est commun à tous les vertébrés (figure 16) mais la taille, la forme, l'ordre et le moment d'apparition des rhombomères peuvent varier. Par exemple, la première frontière à se mettre en place est celle située entre r3 et r4 chez le poisson-zèbre (Moens et al., 1998) et r5 et r6 chez le poulet (Lumsden and Keynes, 1989). Les rhombomères centraux (r2-r6) sont toujours clairement visibles tandis que les rhombomères situés aux extrémités sont des territoires moins bien définis dont les propriétés diffèrent partiellement. L'organisation générale du rhombencéphale est toutefois conservée chez tous les différents groupes de vertébrés, ce qui souligne l'importance fonctionnelle qu'elle revêt au sein de ce taxon.

Dans ce chapitre, les composantes anatomiques et cellulaires de la segmentation du rhombencéphale sont d'abord présentées. Dans un second temps, l'aspect génétique est abordé, les rhombomères constituant des unités d'expression génique dont la composition définit l'identité positionnelle antéro-postérieure, notamment à travers le rôle des gènes *Hox*. Cette identité positionnelle est établie en amont par l'action combinée de voies de signalisation, qui seront décrites en IV avec une emphase particulière sur la voie FGF dont l'étude fait l'objet d'une partie des résultats exposés, et de gènes de segmentation. Leur rôle dans le processus de segmentation sera décrit en V en terminant par les fonctions et la régulation transcriptionnelle de *Krox20* qui constitue le cœur du sujet de ce manuscrit.

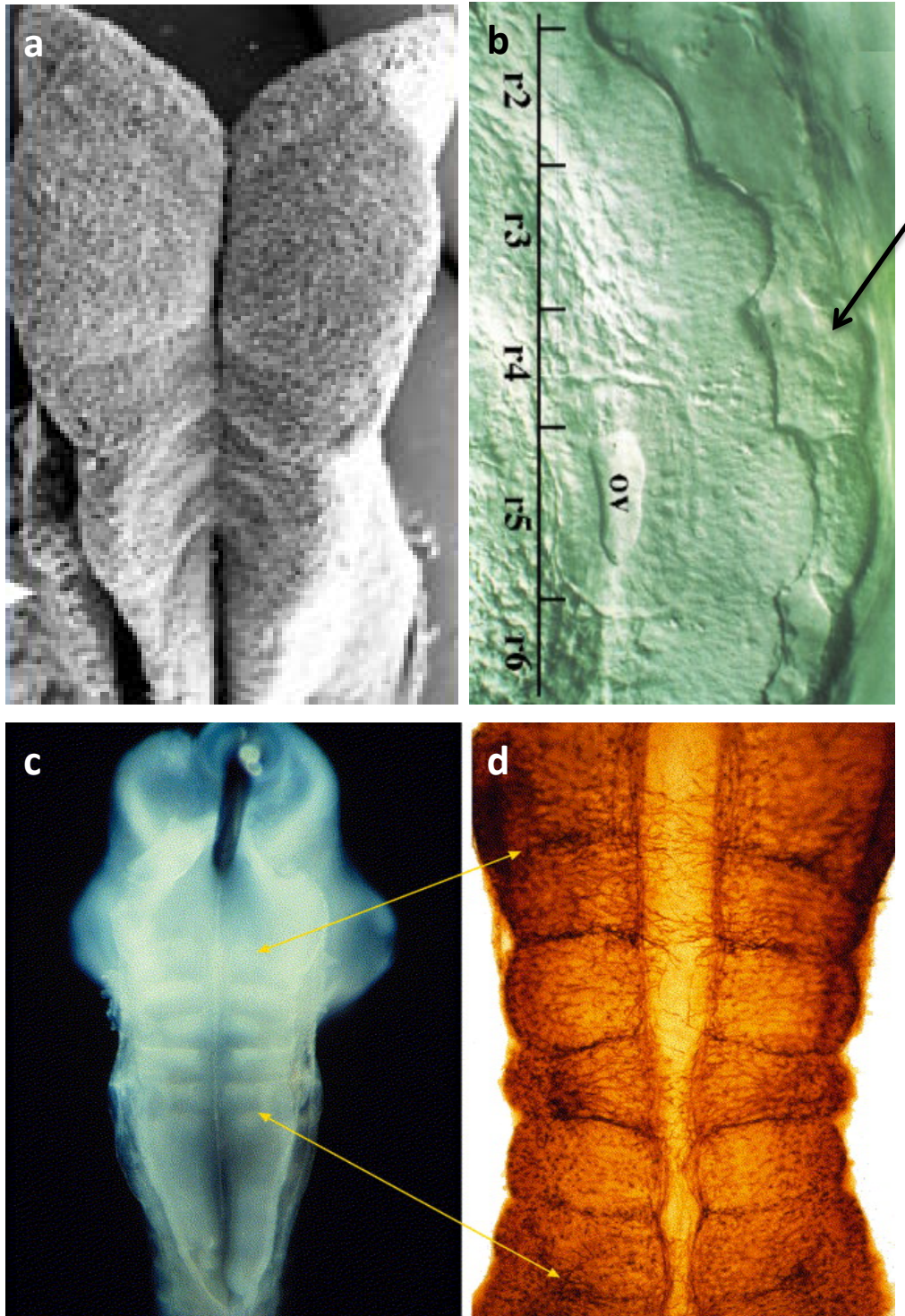


Figure 16. **Conservation de la segmentation morphologique du rhombencéphale chez les vertébrés**

a: vue dorsale en microscopie électronique à balayage du rhombencéphale d'un embryon de souris à 8,5 jpc faisant apparaître les renflements périodiques correspondant aux rhombomères. D'après Lumsden and Keynes, 1989.

b: vue latérale du rhombencéphale d'un embryon de poisson-zèbre 18h après fécondation. Le neuroépithélium est indiqué par une flèche. ov : vésicule otique. D'après Moens and Prince, 2002.

c: vue dorsale d'un embryon de poulet après trois jours d'incubation et dont le toit a été retiré pour faire apparaître la morphologie segmentée du rhombencéphale sous-jacent. Les flèches pointent vers la frontière r1/r2 antérieurement et r6/r7 postérieurement.

d: rhombencéphale monté à plat d'un embryon de poulet au même stade de développement que C après immunomarquage contre les neurofilaments. Le marquage fait apparaître le lien étroit entre organisation neuronale et segmentation. D'après Lumsden, 2004.

III.1. Les rhombomères organisent la neurogénèse dans le rhombencéphale

Le rhombencéphale est à l'origine de différentes populations d'interneurones et de motoneurones dont le développement est conditionné par le processus de segmentation du rhombencéphale (figure 17). Les premiers neurones à être détectés sont les interneurones qui se forment dans les rhombomères pairs d'abord, puis impairs (Lumsden and Keynes, 1989). Les interneurones apparaissent donc selon un patron réitéré identique dans chaque rhombomère. Toutefois, la composition en différents sous-types d'interneurones est spécifique de chaque rhombomère (Clarke and Lumsden, 1993).

Certains motoneurones présentent quant à eux un profil d'organisation répété tous les deux segments. Le nerf trijumeau (V) reçoit des projections venant de r2 et de r3, les nerfs facial (VII) et vestibulo-cochléaire (VIII) de r4 et r5 et le nerf glossopharyngien (IX) de r6 et r7. À chaque fois, les motoneurones des rhombomères impairs s'associent à ceux des rhombomères pairs pour rejoindre des points de sortie situés au niveau des rhombomères 2, 4 et 6. En revanche, d'autres paires de nerfs crâniens ne respectent pas cette règle et sont décalés: le nerf abducens (VI) est formé à partir de r5 et r6 tandis que les rhombomères 7 et 8 donneront naissance aux nerfs vague (X), accessoire (XI) et hypoglosse (XII). Certaines variantes peuvent exister entre les organisations neuronales de la souris, des amphibiens et des téléostéens.

La segmentation du rhombencéphale régit également le processus de migration ventro-latérale des cellules de la CN qui iront donner naissance à l'essentiel du squelette osseux et cartilagineux et des tissus conjonctifs de la tête. Cette migration s'effectue en trois flux placés en regard des rhombomères pairs (r2, r4 et r6) et permet aux cellules de la CN de coloniser les arcs branchiaux adjacents et les ganglions crâniens du système nerveux périphérique. Peu de cellules de crête sont produites au niveau des rhombomères 3 et 5 et celles-ci migrent rostralement et caudalement pour rejoindre les flux provenant des rhombomères pairs (Sechrist et al., 1993) ou entrent en apoptose (Graham et al., 1994). Le destin final des cellules de CN est conditionné par l'identité du rhombomère dont elles proviennent ainsi que par des signaux environnementaux (Santagati and Rijli, 2003).

La segmentation du rhombencéphale est donc indispensable à la formation d'une grande partie des structures céphaliques comme les tissus crânio-faciaux dérivés des

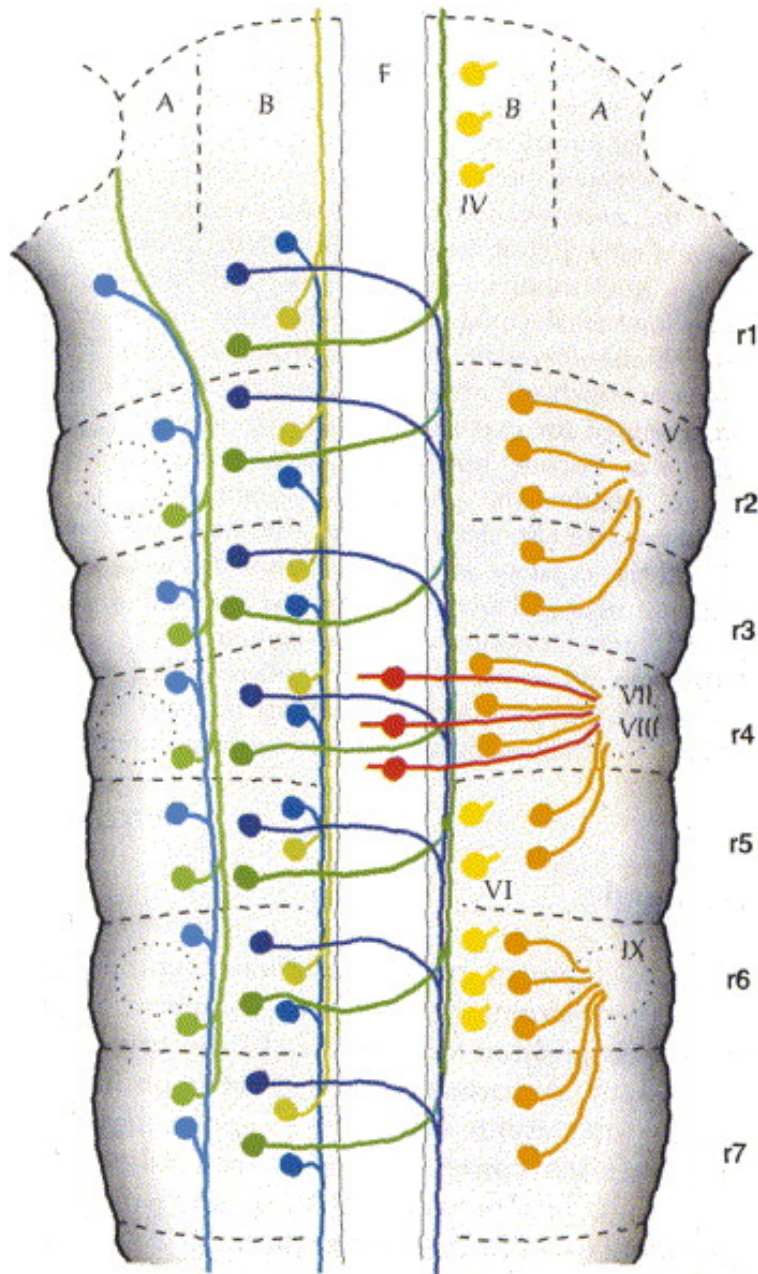


Figure 17. **Organisation cellulaire segmentée du rhombencéphale**

Représentation schématique des principaux types neuronaux dans le rhombencéphale précoce (aviaire). Sur la gauche sont figurés six types d'interneurones distingués selon leur position le long de l'axe transversal, la trajectoire ascendante ou descendante de leur axone et qu'ils franchissent ou non l'axe médian. Les interneurones se différencient de façon répétée dans chaque rhombomère. Sur la droite, les neurones branchiomoteurs des nerfs crâniens V, VII et IX (orange) sont localisés respectivement dans r2-r3, r4-r5 et r6-r7. Ces nerfs quittent le cerveau au niveau des rhombomères pairs (cercles pointillés). Les neurones somatiques des nerfs crâniens IV et VI (jaune) et les afférences contralatérales des neurones du système vestibulo-acoustique (VIII, rouge) sont également représentés.

D'après Lumsden, 2004.

arcs branchiaux ou les nerfs et les ganglions du système nerveux périphérique, ainsi qu'à l'organisation des populations neuronales du tronc cérébral. Bien que la segmentation morphologique du rhombencéphale soit transitoire, des études de lignage de rhombomères individuels montrent que l'ordre des neurones au sein des noyaux du cerveau postérieur adulte respecte l'ordre AP selon lequel ils ont été générés au cours de la segmentation du rhombencéphale (Oury et al., 2006; Pasqualetti et al., 2007).

III.2. Les rhombomères constituent des unités de lignage cellulaire

La segmentation du rhombencéphale s'accompagne également de la restriction des mouvements cellulaires entre rhombomères. Des expériences de marquage cellulaire montrent que les cellules d'un rhombomère et leurs descendances peuvent se disperser librement au sein d'un rhombomère mais ne peuvent plus traverser les frontières inter-rhombomériques à partir du stade 10 somites (figure 18, Fraser et al., 1990).

Bien que le confinement des mouvements cellulaires au sein de chaque rhombomère coïncide avec l'apparition des frontières rhombomériques, celles-ci ne sont vraisemblablement pas responsables de cette restriction. En effet, leur ablation génétique ne perturbe pas la ségrégation des populations cellulaires (Nittenberg et al., 1997). Leur rôle consisterait plutôt à agir comme centre organisateur local tardif intervenant dans la neurogénèse des rhombomères adjacents (Riley et al., 2004; Amoyel et al., 2005).

Le confinement cellulaire provient en réalité de différences de propriétés d'adhésion cellulaire entre rhombomères pairs et impairs. Des expériences de greffe de cellules montrent que le mélange de cellules de rhombomères pairs et impairs conduit à la ségrégation physique des deux populations et à la formation d'une frontière morphologique tandis que des cellules de rhombomères de parité identique se mélangent sans former de frontière (Guthrie and Lumsden, 1991; Guthrie et al., 1993). Ces propriétés adhésives alternées sont conférées par l'expression segmentée de deux types de protéines transmembranaires : les récepteurs à activité tyrosine kinase Eph exprimés principalement dans les rhombomères impairs (Becker et al., 1994) et leurs

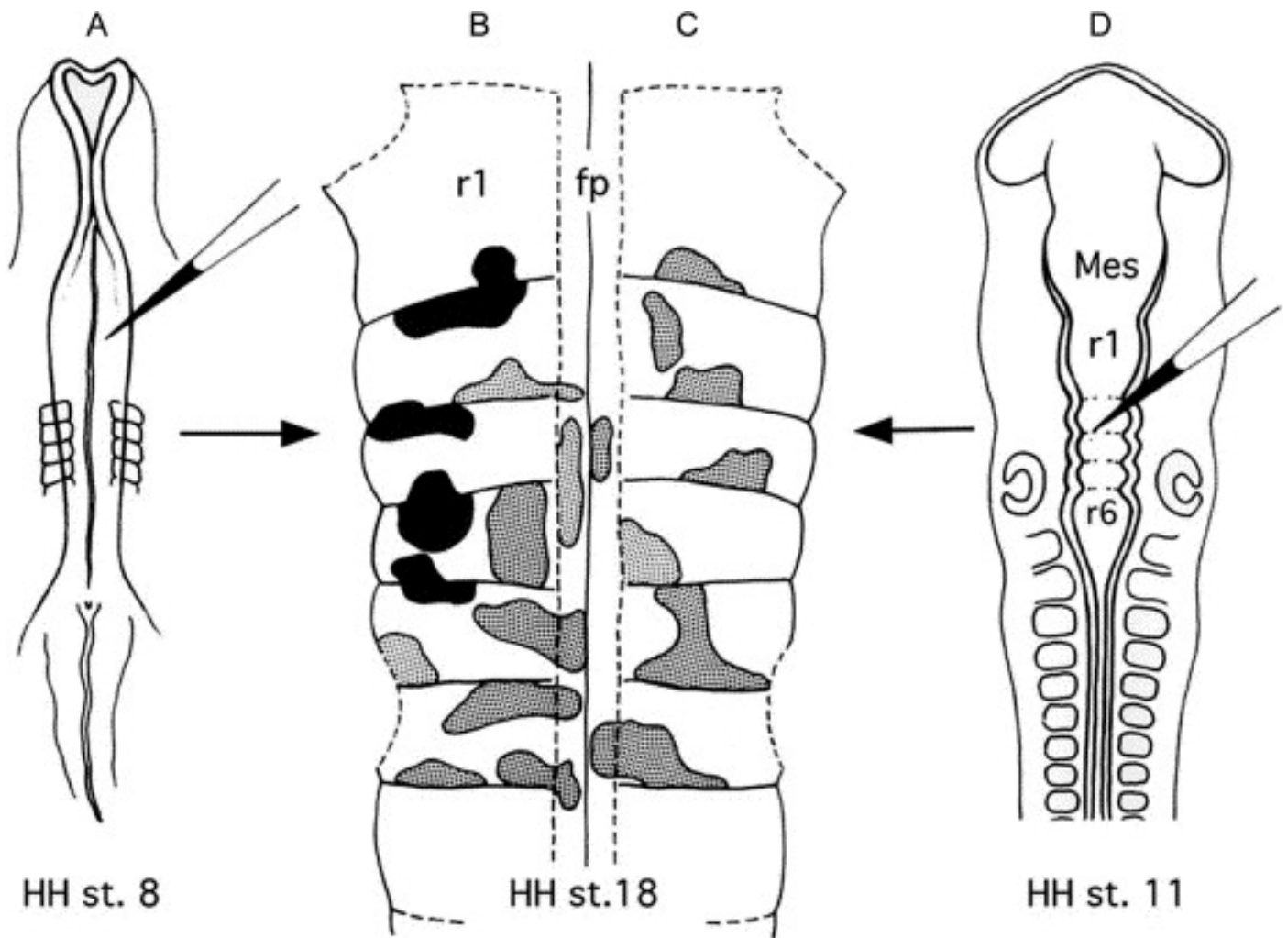


Figure 18. **Restriction de la migration cellulaire dans le rhombencéphale**

Schéma présentant les expériences mettant en évidence la restriction du lignage cellulaire dans le rhombencéphale: des cellules isolées du neuroépithélium sont marquées avec un traceur coloré avant (stade HH8, A) ou après (stade HH11, D) l'apparition des frontières inter-rhombomériques. Au stade HH18 (milieu, montage à plat), les cellules marquées à HH8 engendrent des clones pouvant coloniser plusieurs rhombomères adjacents (zones noires, B) tandis que les descendantes des cellules marquées à HH11 sont systématiquement confinées à un seul rhombomère (zones grises, C). Les clones issus de la plaque du plancher (fp) ne présentent pas de signe de restriction de migration cellulaire.

HH : stades de Hamburger-Hamilton.

D'après Fraser et al., 1990.

ligands, les ephrines, exprimés plus fortement dans les rhombomères pairs (Bergemann et al., 1995; Cheng and Flanagan, 1994).

Le système Eph-ephrine induit la répulsion réciproque des populations de cellules exprimant chacun un composant différent tandis qu'il promeut l'adhésion des cellules exprimant le même composant (Cooke et al., 2005). L'expression alternée des gènes Eph et ephrine dans le rhombencéphale conduit donc à la ségrégation cellulaire entre rhombomères. Ainsi, si des cellules surexprimant *EphA4* sont greffées sur un embryon sauvage, celles-ci seront principalement retrouvées au niveau des rhombomères 3 et 5. À l'inverse, l'inactivation d'*EphA4* chez les cellules greffées conduit à leur exclusion des rhombomères 3 et 5 (Cooke et al., 2005).

Le rôle central pour la compartimentation cellulaire du rhombencéphale joué par le système Eph-Ephrine est illustré par les conséquences d'une inactivation de ce système (Cooke et al., 2005). Celle-ci entraîne une perte de segmentation et une absence de formation des frontières inter-rhombomériques ainsi qu'une désorganisation des populations neuronales. Les propriétés du système Eph-ephrine permettent donc d'expliquer le tri et le regroupement des cellules dans les différents territoires ainsi que l'apparition de limites franches entre rhombomères adjacents. En effet, des cellules se situant du côté d'une frontière ne concordant pas avec leur identité vont être repoussées vers le rhombomère correspondant à celle-ci (figure 19). Deux autres mécanismes, probablement de moindre importance, sont également envisagés pour expliquer la formation de frontières nettes entre rhombomères : l'apoptose des cellules incorrectement localisées ou leur respécification en cellules d'identité conforme au rhombomère dans lequel elles se trouvent (Trainor and Krumlauf, 2000; Cooke and Moens, 2002).

La restriction du lignage cellulaire est donc une conséquence de l'expression segmentalisée des Eph et des ephrines dans le rhombencéphale. En maintenant cohérente l'identité des rhombomères, elle est également intimement liée à leur statut d'unité d'expression génique.

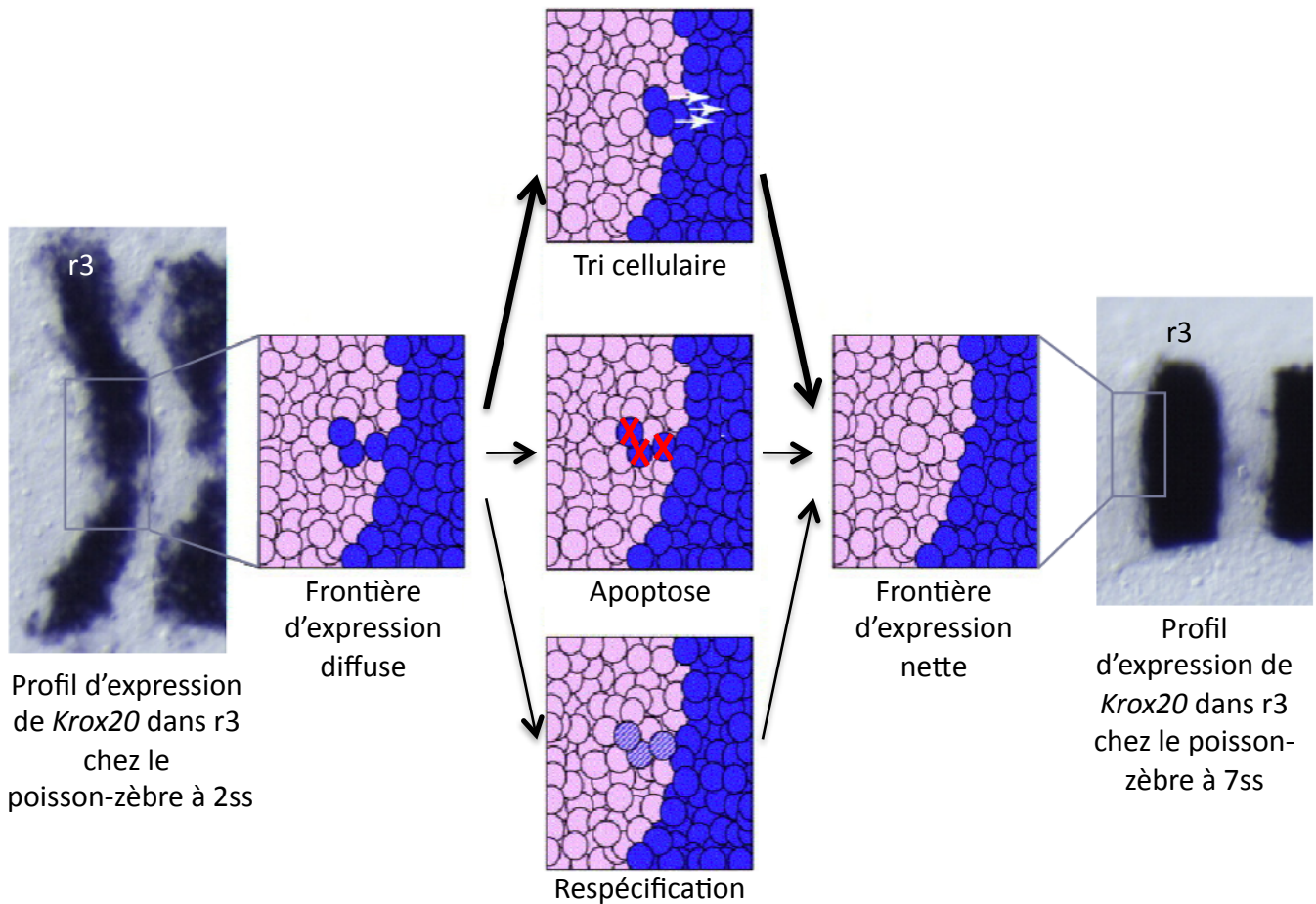


Figure 19. Mécanismes de formation des frontières inter-rhombomériques

Trois mécanismes sont susceptibles d'expliquer l'établissement de frontières nettes entre rhombomères visualisé par le profil d'expression de *Krox20* chez le poisson-zèbre à 2ss (gauche) et à 7ss (droite). Le tri cellulaire découlant de propriétés adhésives différentes entre rhombomères adjacents permet aux cellules se trouvant du « mauvais côté » d'une frontière présumptive de migrer de l'autre côté. La mort cellulaire programmée (apoptose) élimine les cellules localisées incorrectement tandis que la plasticité cellulaire permet que celles-ci soient respécifiées et acquièrent une identité similaire à celle de leurs voisines. Modifié à partir de Cooke et Moens, 2002.

III.3. Les rhombomères sont des unités d'expression génique

De nombreux gènes sont exprimés de façon régionalisée le long de l'axe AP dans le rhombencéphale et présentent des frontières d'expression coïncidant avec ou préfigurant les frontières morphologiques entre rhombomères. Les rhombomères vont donc constituer des unités d'expression génique, toutes les cellules d'un segment exprimant un même ensemble de gènes qui sera différent dans chaque rhombomère (figure 20). La plupart de ces gènes vont participer activement au processus de segmentation et à la régionalisation AP du rhombencéphale. Les Eph et les ephrines dont nous avons déjà abordé le rôle dans le tri cellulaire définissent une première catégorie de gènes à l'expression régionalisée. On distingue également les gènes de segmentation, dont la mutation entraîne la perte d'un ou plusieurs rhombomères. Six ont été formellement caractérisés à ce jour : *Krox20*, *Gbx2*, *vHNF1*, *MafB*, *Iro7* et les gènes *Hox* du groupe paralogue 1. Nous redeviendrons en détail sur chacun d'entre eux dans la partie suivante. Enfin, une dernière catégorie importante de gènes à l'expression régionalisée concerne les gènes de sélection homéotique *Hox*, qui attribuent à chaque rhombomère son identité AP.

III.3.a) Les gènes *Hox* et l'identité positionnelle

Les gènes de la famille *Hox* codent pour des FTs capables de se lier à des domaines spécifiques d'ADN, appelés homéoboîtes, via un motif très conservé de 60 acides aminés : l'homéodomaine. Les gènes *Hox* ont d'abord été identifiés chez la drosophile où ils sont impliqués dans la spécification de l'identité AP des segments de la larve. Ils agissent en tant que sélecteurs de programme développemental en régulant un ensemble de cibles qui vont mettre en place les différentes structures anatomiques de l'embryon. Ils sont regroupés au sein de deux complexes : *Ant-C* et *Bx-C*, initialement réunis au sein d'un seul complexe (Negre and Ruiz, 2007) et collectivement désignés sous le nom de complexe *HOM-C* (figure 21). Leur expression dans la larve de drosophile est dite colinéaire : les gènes les plus en 3' du complexe sont exprimés plus tôt et leur limite antérieure d'expression est plus rostrale. La modification de l'expression des gènes *Hox* conduit à des transformations homéotiques de type antériorisante dans le cas d'une perte de fonction et postériorisante pour celui d'une surexpression ectopique. La

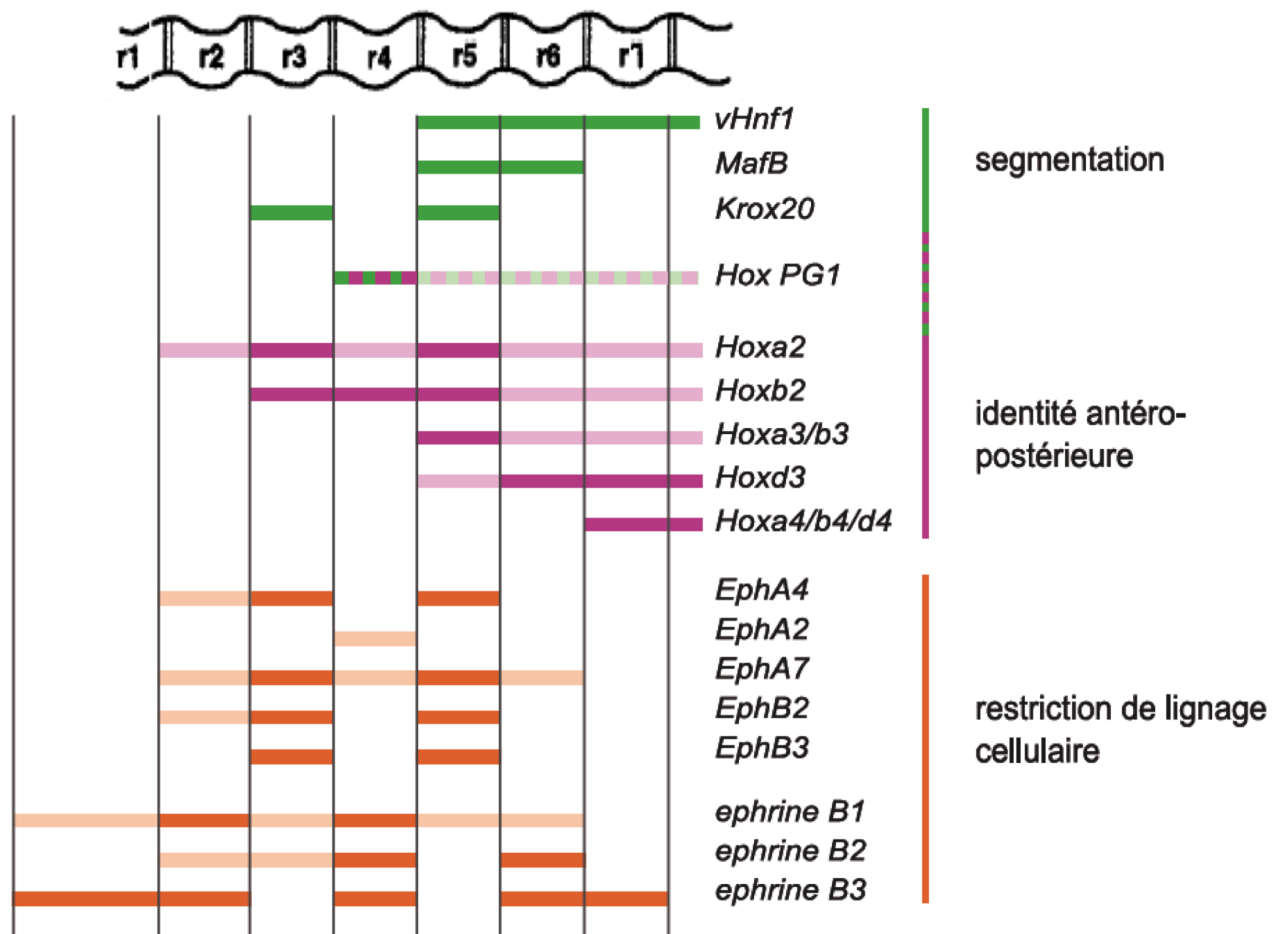


Figure 20. Gènes au profil d'expression segmenté dans le rhombencéphale

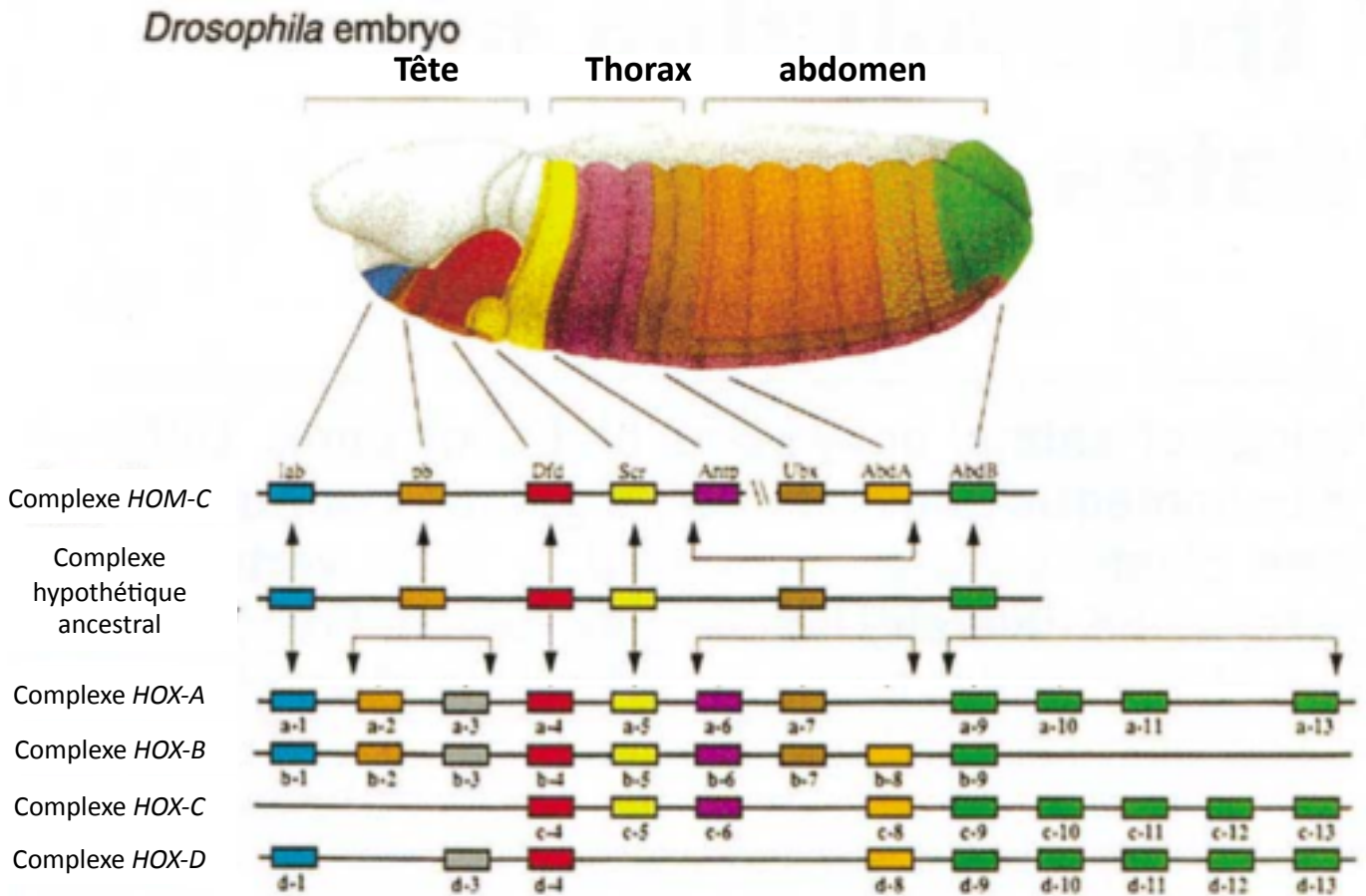
Représentation schématisque des profils d'expression dans le rhombencéphale des gènes impliqués dans le processus de segmentation (vert), d'acquisition d'identité antéro-postérieure (rose, notez la nature bivalente des gènes *Hox* du groupe paralogue 1) et de ségrégation cellulaire (orange). L'intensité de la couleur reflète le niveau relatif de transcrit. r : rhombomère
Modifié à partir de Lumsden et Krumlauf, 1996.

mise en place du plan AP de la drosophile dépend donc de l'établissement d'un 'code *Hox*' qui confère à chaque segment son identité.

Cette fonction d'organisation de l'axe AP est conservée chez les vertébrés où les gènes *Hox* sont distribués en quatre complexes sur des chromosomes différents (*HoxA-D*) résultant de duplications anciennes dans le lignage des vertébrés (figure 21). Au sein de ces complexes, les gènes *Hox* sont répartis en 13 groupes paralogues (*Hox1* à *Hox13*) mais aucun complexe ne contient les 13 paralogues du fait de nombreuses pertes de gènes ayant eu lieu au cours de l'évolution : le nombre total de gènes *Hox* chez l'humain et la souris est de 39. Les téléostéens ont connu une duplication majeure supplémentaire de leur génome et les gènes *Hox* y sont organisés en sept complexes, un des deux complexes *HoxD* ayant été entièrement perdu (Amores, 1998). À nouveau, de nombreuses pertes de gènes amènent à un nombre total de 48 gènes *Hox* chez les téléostéens (Moens and Prince, 2002).

Chez la souris, 10 membres des quatre premiers groupes paralogues (*Hox1* à *Hox4*) sont exprimés dans le rhombencéphale. La limite antérieure d'expression de ces gènes correspond aux frontières rhombomériques présomptives et celle-ci suit également le principe de colinéarité spatiale et temporelle : les gènes du groupe paralogue (PG) 1 s'expriment les premiers et ceux du groupe PG4 s'expriment les derniers et de façon plus caudale. La seule exception concerne l'expression spatiale du groupe PG1 qui est postérieure à celle des gènes du groupe PG2 (voir figure 22). Comme chez la drosophile, la combinatoire de gènes *Hox* va spécifier l'identité AP de chaque segment et une modification de l'expression des gènes *Hox* entraîne des modifications homéotiques partielles en terme de phénotypes anatomique et génétique. Par exemple, l'inactivation du gène *Hoxb1* conduit à une respécification partielle de r4 en r2 avec une perturbation du développement du nerf facial (Gaufo et al., 2000; Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996). Inversement, l'expression ectopique de *Hoxb1* dans r2 y entraîne l'apparition ectopique de neurones typiques de r4 (Jungbluth et al., 1999). De façon similaire, l'inactivation de *Hoxa2* conduit à ce que le rhombomère 2 adopte partiellement une identité moléculaire et anatomique de type r1 (Gavalas et al., 1997) tandis que sa surexpression ectopique conduit au phénotype inverse (Grammatopoulos et al., 2000; Eddison et al., 2004).

Ainsi, comme chez la drosophile, une perte de fonction induit l'acquisition d'une identité plus antérieure, tandis qu'un gain de fonction entraîne l'adoption d'une identité



Embryon de souris



Figure 21. Comparaison de l'organisation génomique et des profils d'expression des gènes *Hox* chez les arthropodes et les vertébrés

Haut et bas: Colinéarité spatiale d'expression des gènes *Hox* dans les segments successifs le long de l'axe AP des embryons de drosophile et de souris.

Milieu: organisation génomique du complexe *HOM-C* de drosophile, des quatre complexes *Hox* de souris et du complexe ancestral présumé déduit des comparaisons entre les arthropodes et les chordés.

Modifié à partir de Carroll, 1995.

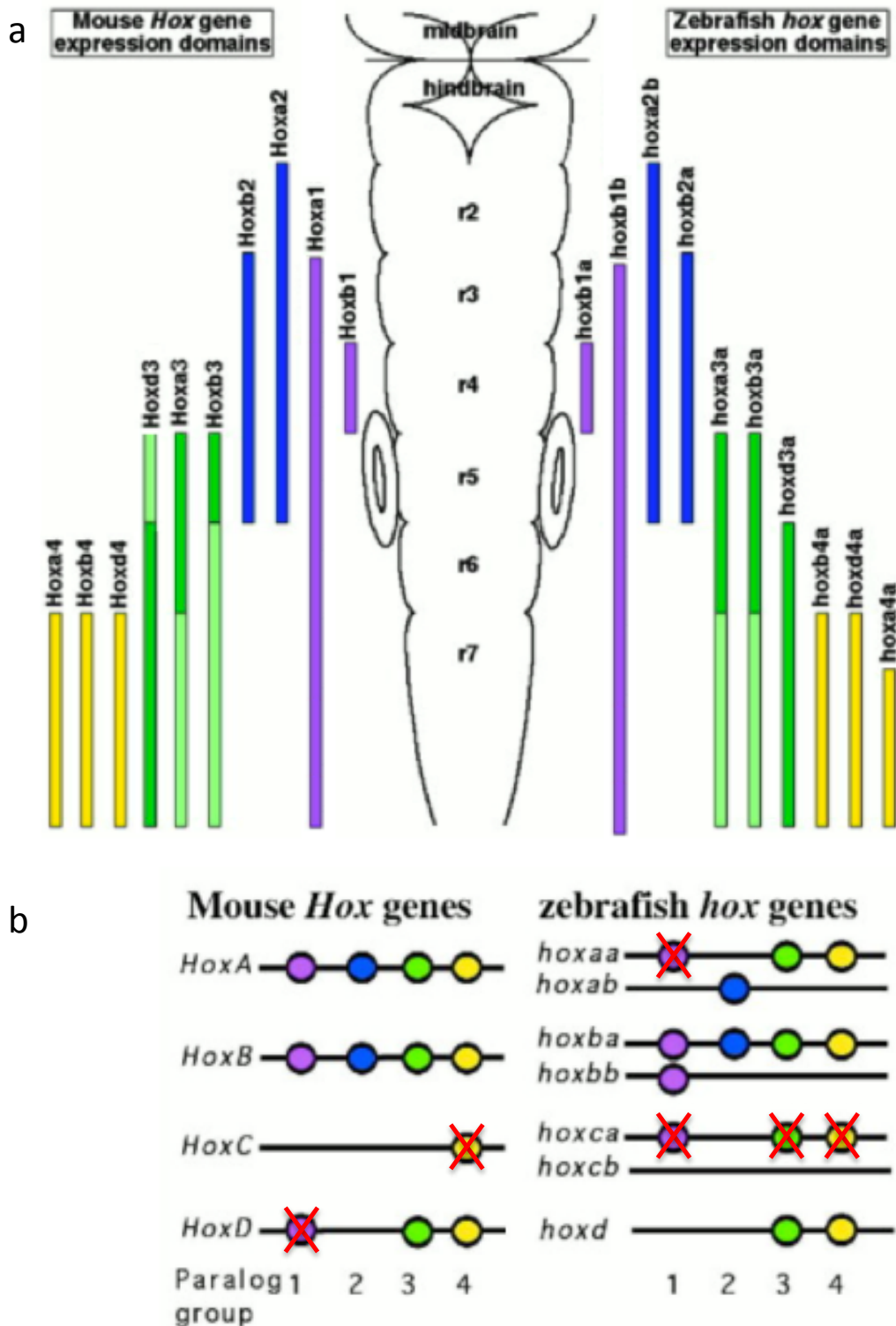


Figure 22. Comparaison des domaines d'expression dans le rhombencéphale et de l'organisation en clusters des gènes *Hox* PG1-4 chez la souris et le poisson-zèbre

a: Représentation schématique des territoires d'expression des gènes *Hox* PG1-4 chez la souris et le poisson-zèbre. Les différents groupes paralogues sont associés à des couleurs spécifiques dont l'intensité corrèle avec le niveau d'expression des gènes représentés: mauve (PG1), bleu (PG2); vert (PG3), jaune (PG4). Bien que le poisson-zèbre aie deux gènes *Hox* PG1-4 de plus que la souris, chaque rhombomère exprime un sous-ensemble de gènes *Hox* similaire dans les deux espèces. Les gènes *Hoxd1*, *Hoxc4*, *hoxa1a*, *hoxc1a*, *hoxc3a* et *hoxc4a* ne sont pas exprimés dans le rhombencéphale et ne sont pas représentés.

r : rhombomère

b: Représentation de l'organisation des 4 clusters murins de gènes *Hox* et des 7 clusters de poisson-zèbre montrant les 4 premiers groupes paralogues selon un code couleur identique au a. Les gènes non exprimés dans le rhombencéphale sont barrés.

Modifié de Moens and Prince, 2002.

plus postérieure. La fonction postériorisante des gènes *Hox* est un mécanisme général et il est admis que les gènes *Hox* agissent en conférant une identité caudale à un état de base rostral. Dans le rhombencéphale, l'état de base est l'identité r1. L'inactivation de tout le système *Hox* par l'inhibition des cofacteurs *Pbx* entraîne d'ailleurs la respécification du rhombencéphale entier vers une identité de type r1 (Waskiewicz et al., 2002).

Bien que fascinante, l'analogie avec le système de segmentation chez la drosophile présente des limites. En premier lieu, les changements d'identité induits par la modification de l'expression d'un gène *Hox* sont le plus souvent partiels, vraisemblablement du fait de redondances fonctionnelles entre les gènes paralogues de vertébrés. La combinaison de mutations au sein d'un groupe paralogue conduit d'ailleurs à des phénotypes plus drastiques (Davenne et al., 1999; McClintock et al., 2002; Studer et al., 1998; Gaufo et al., 2003; Greer et al., 2000; Manley and Capecchi, 1997). De plus, alors que chez la drosophile les gènes de segmentation responsables de l'établissement des territoires et les gènes homéotiques spécifiant l'identité de ces territoires sont distincts, ces deux processus sont nettement plus intriqués dans le rhombencéphale des vertébrés. Ainsi, comme nous le verrons plus bas, les gènes d'identité *Hox* PG1 sont également directement impliqués dans la mise en place d'un rhombencéphale segmenté. À l'inverse, des gènes de segmentation comme *Krox20* ou *MafB* agissent aussi en spécifiant l'identité AP des segments dans lesquels ils sont exprimés.

III.3.b) Régulation des gènes *Hox* dans le rhombencéphale

L'acide rétinoïque (AR) est le régulateur des gènes *Hox* dans le rhombencéphale le mieux caractérisé. Nous reviendrons plus en détail sur le rôle de cette voie de signalisation dans le développement du tube neural. De nombreux gènes *Hox* possèdent dans leurs séquences régulatrices des éléments de réponse à l'AR (RARE) – c'est le cas des gènes *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxa4*, *Hoxb4* et *Hoxd4* (Marshall et al., 1994; Frasch et al., 1995; Morrison et al., 1996; Gould et al., 1998; Packer et al., 1998) – et la délétion de ces sites altère l'expression des *Hox* dans le rhombencéphale, confirmant l'implication de la voie AR dans la régulation des gènes homéotiques (Dupé et al., 1997; Gavalas et al., 1998; Studer et al., 1998).

D'autres facteurs sont aussi nécessaires au contrôle de l'expression des gènes *Hox*. La voie FGF par exemple ajoute un niveau de régulation. Antérieurement, le signal FGF d'origine isthmique réprime l'expression des *Hox* comme *Hoxa2* (Irving and Mason, 2000) tandis que les protéines FGF3 et FGF8, secrétées au niveau de r4, semblent être nécessaires à l'expression du gène *Hoxa2* dans le futur territoire r2-r3 (Walshe et al., 2002).

De plus, les gènes de segmentation comme *Krox20* et *MafB* et de nombreux mécanismes d'autorégulation, de régulation croisée et de répression entre paralogues viennent affiner et complexifier le schéma de régulation des *Hox* dans le rhombencéphale dont on peut tenter un résumé comme suit (figure 23, revu ici : Tümpel et al., 2009; Alexander et al., 2009) :

- dans r2, l'identité est définie par l'expression du seul gène *Hox* *Hoxa2*. Son expression est activée par la voie de signalisation FGF et par les FTs *Irx1b*, *Irx7* – en synergie avec *Meis1.1* – ainsi que par les *Sox1* à 3 (Walshe et al., 2002; Tümpel et al., 2008; Stedman et al., 2009).
- dans r3, *Krox20* joue un rôle central dans la délimitation et l'identité du segment. Son expression est induite par *Hoxa1*, *Hoxb1* et leurs cofacteurs *Meis* et *Pbx*, ainsi que par les facteurs *Irx1b* et *Irx7* (Wassef et al., 2008; Stedman et al., 2009). Elle nécessite également l'activation de la voie FGF (Marín and Charnay, 2000; Walshe et al., 2002). *Krox20* exerce un rétro-contrôle négatif sur *Hoxb1*, potentiellement en séquestrant son coactivateur *PiASxβ*, et contribue ainsi à l'établissement de la frontière r3/r4 (Giudicelli et al., 2001; Garcia-Dominguez et al., 2006). *Krox20* induit également directement l'expression de *Hoxa2* et *Hoxb2* (Sham et al., 1993; Maconochie et al., 2001).
- Dans r4, le territoire est défini par l'expression de *Hoxb1* qui est renforcée par des boucles d'auto- et d'inter-régulation avec *Hoxa1*, *Hoxb2* et *Hoxa2* également présents (Maconochie et al., 1997; Ferretti et al., 2005; Tümpel et al., 2007). L'expression de *Krox20* est inhibée dans ce rhombomère par l'action de *Hoxa1* et *Hoxb1*. En effet, dans le double mutant *Hoxa1-Hoxb1*, le territoire d'expression de *Krox20* est étendu caudalement dans r4 (Studer et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999). Cette inhibition fait vraisemblablement intervenir les répresseurs *nlz1* et *nlz2* (Runko and Sagerström, 2003, 2004; Hoyle et al., 2004; Nakamura et al.,

Figure 23. Acteurs moléculaires de la spécification AP du rhombencéphale

a: Le gradient d'AR (figuré en jaune) induit l'expression des gènes *Hox* PG1, des gènes *Nlz1* et *2* et de *vHnf1*. En présence d'*Irx7* et des signaux FGFs en provenance de r4, les gènes *Hox* PG1 vont activer l'expression de *Krox20* dans r3. Postérieurement, la répression mutuelle entre *Irx7* et *vHnf1* positionne la frontière r4/r5. *vHnf1* et les FGFs activent *MafB* et tous coopèrent pour induire l'expression de *Krox20* dans r5. Les *Nlz* limitent l'activation de l'expression de *Krox20* en la réprimant dans r4.

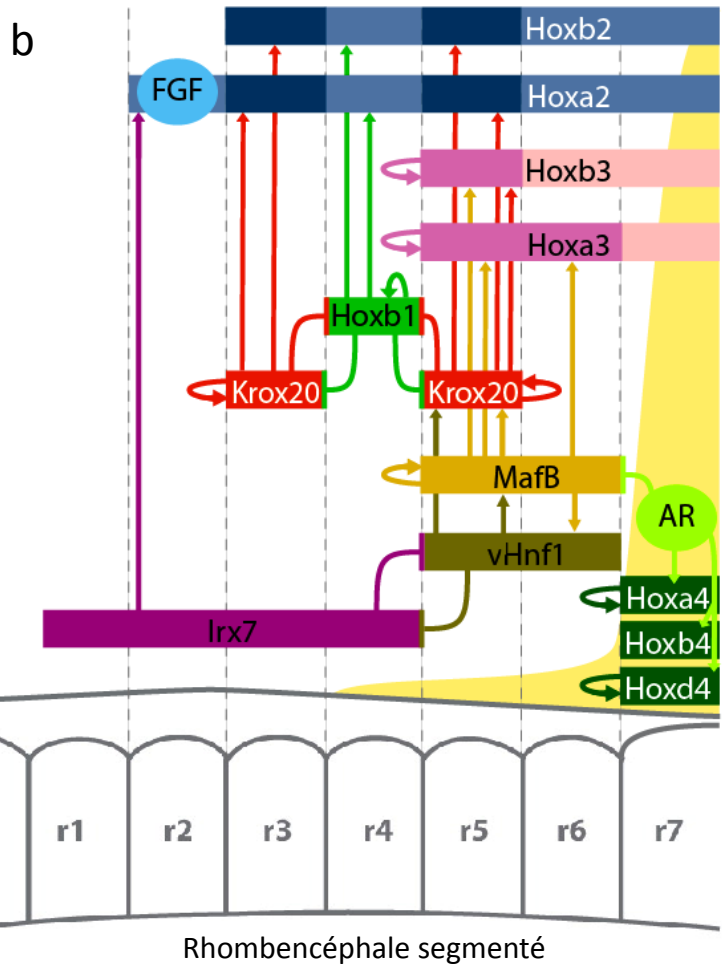
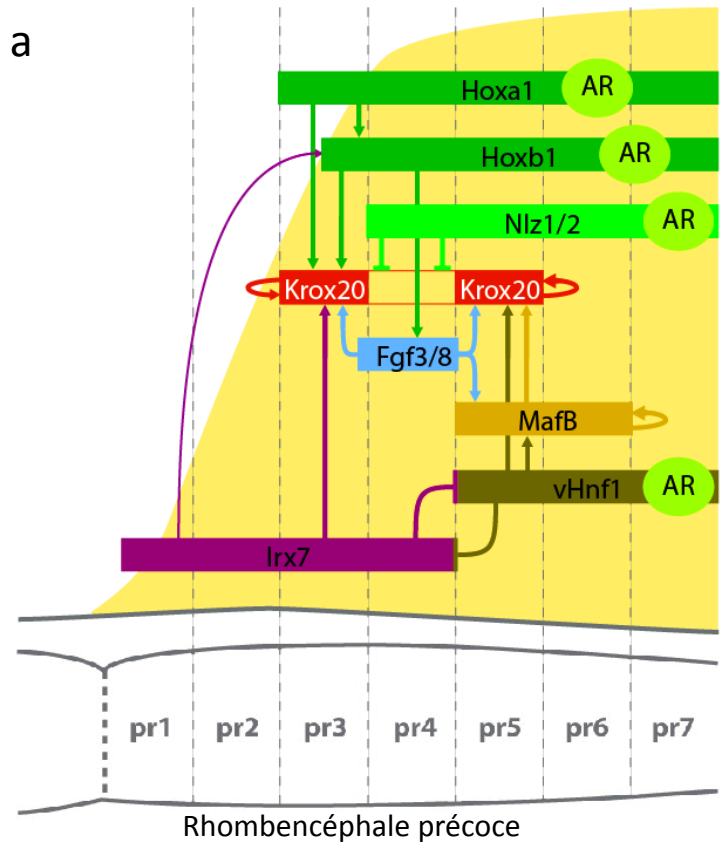
pr: pré-rhombomère

b: La répression mutuelle de *Krox20* et *Hoxb1* fixe les territoires r3, r4 et r5. Ces deux facteurs, avec *vHnf1*, *MafB*, *Irx7* et la signalisation FGF vont orchestrer la mise en place du code *Hox* dans les rhombomères 2 à 6. Postérieurement, l'AR induit l'expression des gènes *Hox* PG4 dans r7.

Les flèches représentent des interactions directes ou indirectes.

r : rhombomère

Modifié de Alexander et al., 2009.



2008) selon un mécanisme en cours d'étude par Charlotte Labalette au laboratoire.

- Comme pour la frontière r3/r4, la limite caudale d'expression de *Hoxb1* est déterminée par la répression par *Krox20* dans r5 et le positionnement initial de la frontière r4/r5 lui-même découle de la répression mutuelle précoce entre les facteurs *vHnf1* et *Irx7* (Lecaudey et al., 2004).
- dans r5 et r6, le facteur *vHnf1* joue un rôle de chef d'orchestre : il inhibe d'une part l'identité r4 en réprimant *Hoxb1* et *Irx7* (Hernandez et al., 2004b; Lecaudey et al., 2004) et active d'autre part l'expression du gène *MafB* en synergie avec les signaux FGF (Kim et al., 2005a). *vHnf1*, *MafB* et les FGFs coopèrent ensuite pour activer de façon directe *Krox20* dans r5 (McKay et al., 1994; Moens et al., 1996; Chomette et al., 2006; Labalette et al., 2011). Le mécanisme empêchant *Krox20* d'être également exprimé dans r6 n'est pas encore élucidé. *Krox20* et *MafB* activent ensuite l'expression de *Hoxb3* dans r5 tandis que *MafB* induit celle de *Hoxa3* dans r5-r6 (Manzanares et al., 1999a, 2002). L'expression de *Hoxa3* est maintenue par une boucle d'autorégulation directe (Manzanares et al., 2001).
- dans r7, l'identité est définie par la coexpression des gènes *Hoxa4*, *Hoxb4* et *Hoxd4* sous le contrôle de l'AR et de boucles d'autorégulation et de régulation croisée (Packer et al., 1998; Serpente et al., 2005).

Ainsi, les gènes *Hox*, en collaboration étroite avec les différentes voies de signalisation dans le rhombencéphale et les gènes de segmentation, organisent le processus de segmentation et spécifient l'identité antéro-postérieure des rhombomères. Un travail important se focalise également sur l'identification des deux autres familles d'acteurs que sont les molécules diffusibles et les gènes de segmentation, ainsi que leurs mécanismes d'action.

III.4. Les voies de signalisation impliquées dans la segmentation du rhombencéphale

La segmentation du rhombencéphale peut s'interpréter comme un raffinement progressif de la régionalisation AP, qui commence avec l'établissement de larges territoires définis par des gradients de molécules diffusibles qui vont réguler l'expression de gènes de segmentation, ceux-ci induisant eux-mêmes, en collaboration avec ces différentes voies de signalisation, l'expression des gènes *Hox* assurant l'identité de chaque segment. Les trois voies de signalisation AR, FGF et Wnt, dont le rôle central dans la mise en place globale de la plaque neurale a déjà été abordé, participe également au processus de segmentation (figure 24).

III.4.a) Le rôle postérieur de l'AR

Comme nous en avons déjà eu un aperçu au paragraphe précédent avec la régulation des *Hox*, l'AR est un acteur majeur de la régionalisation du rhombencéphale, en particulier pour le rhombencéphale postérieur : le futur territoire r4-r7. C'est un dérivé de la vitamine A secrété à partir du mésoderme paraxial et des somites antérieurs par des cellules exprimant l'enzyme de synthèse de l'AR : la rétinaldéhyde déshydrogénase (*Raldh2*). Antérieurement, l'AR est dégradé par les enzymes *Cyp26* exprimées d'abord dans r2 puis dans r4 (Sirbu et al., 2005). Cela crée un gradient postérieur>antérieur en AR auquel la partie antérieure r3-r4 du rhombencéphale est soumise pendant un court laps de temps tandis que le temps d'exposition de la partie postérieure r5-r8 est plus long (figure 25a). L'AR agit en se fixant aux récepteurs hormonaux hétérodimériques nucléaires RAR/RXR qui vont ensuite activer la transcription de gènes en se liant à des séquences RARE sur l'ADN. À l'inverse, en l'absence d'AR, les RAR/RXR peuvent réprimer de façon active la transcription de certains gènes en recrutant des facteurs de modification de la chromatine (Weston et al., 2003). Certains récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire tandis que d'autres montrent une expression régionalisée et l'inactivation indépendante de chacun des récepteurs ne produit aucun phénotype chez la souris, suggérant un certain degré de redondance fonctionnelle (Kastner et al., 1997).

Des expériences de perte de fonction de la voie de signalisation AR, que ce soit par mutation de l'enzyme productrice *Raldh2* chez la souris ou l'utilisation du DEAB

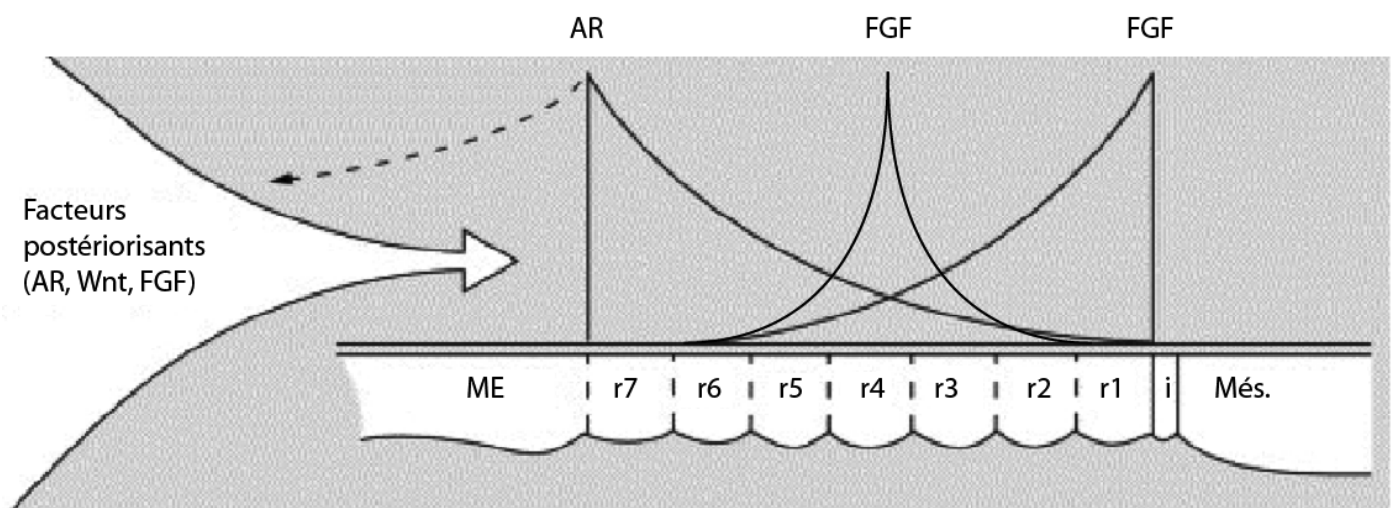


Figure 24. **Gradients des principales voies de signalisation impliquées dans la segmentation du rhombencéphale**

Modèle de distribution des gradients de morphogènes postérieurs et des gradients locaux dans le rhombencéphale.

i : isthme, ME : Moelle épinière, Més : Mésencéphale.

Modifié à partir de Gavalas et Krumlauf, 2000.

(diethylaminobenzaldehyde) – un inhibiteur de son activité – chez le poisson-zèbre, entraîne la disparition des rhombomères postérieurs r5-r7 au profit de r3 et r4 (figure 25b, Niederreither et al., 2000; Maves and Kimmel, 2005), illustrent l'implication de l'AR dans la régionalisation du rhombencéphale postérieur. Confortant ces données, le gain de fonction par surexpression de *Radlh2* entraîne une réduction du cerveau antérieur et une postériorisation du rhombencéphale (Chen et al., 2001). L'AR induit en effet l'expression des gènes *Hox* des groupes PG 1 et 4 et de *vHnf1* dans le rhombencéphale de façon directe (Marshall et al., 1994; Frasch et al., 1995; Morrison et al., 1996; Kastner et al., 1997; Gould et al., 1998; Packer et al., 1998; Pouilhe et al., 2007). De façon intéressante, les gènes les plus en 3' des complexes *Hox* sont induits par des doses plus faibles et à des stades plus précoces que les gènes situés en 5' (Simeone et al., 1990, 1991; Papalopulu et al., 1991). De même, la spécification des rhombomères postérieurs requiert une concentration plus importante et une exposition plus longue que les rhombomères antérieurs (Dupé and Lumsden, 2001).

L'absence complète de segmentation morphologique dans le mutant *Radlh2*^{-/-} suggère qu'en plus de son activité dans le rhombencéphale postérieur, l'AR joue un rôle antérieurement à r5, ce qui est renforcé par la présence de RAREs dans les séquences cis-régulatrices de *Hoxa1* et *Hoxb1*. Toutefois, la nature de ce rôle et ses mécanismes d'action ne sont pas compris aujourd'hui et l'étude en est compliquée par l'intervention d'autres voies de signalisation.

III.4.b) La voie de signalisation FGF

La voie de signalisation FGF intervient dans de très nombreux processus développementaux. Nous avons déjà décrit le rôle des FGFs dans l'induction de la plaque neurale. Les FGFs sont également impliqués dans :

- le contrôle des mouvements morphogénétiques lors de la gastrulation (Meyers et al., 1998)
- le contrôle de la somitogénèse (Dubrulle et al., 2001)
- l'induction et la régionalisation dorsoventrale du mésoderme (Kumano and Smith, 2002)
- le contrôle de l'asymétrie droite/gauche (Meyers and Martin, 1999)
- la différenciation de l'endoderme viscéral en foie et en poumons (Serls et al., 2005)

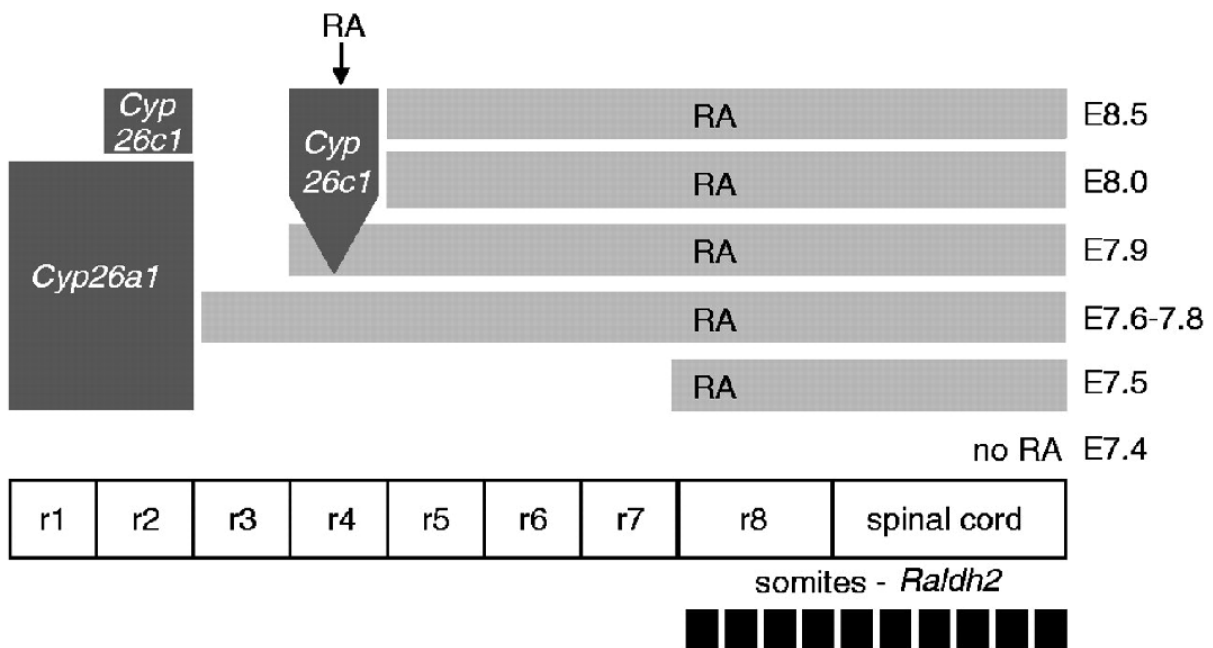
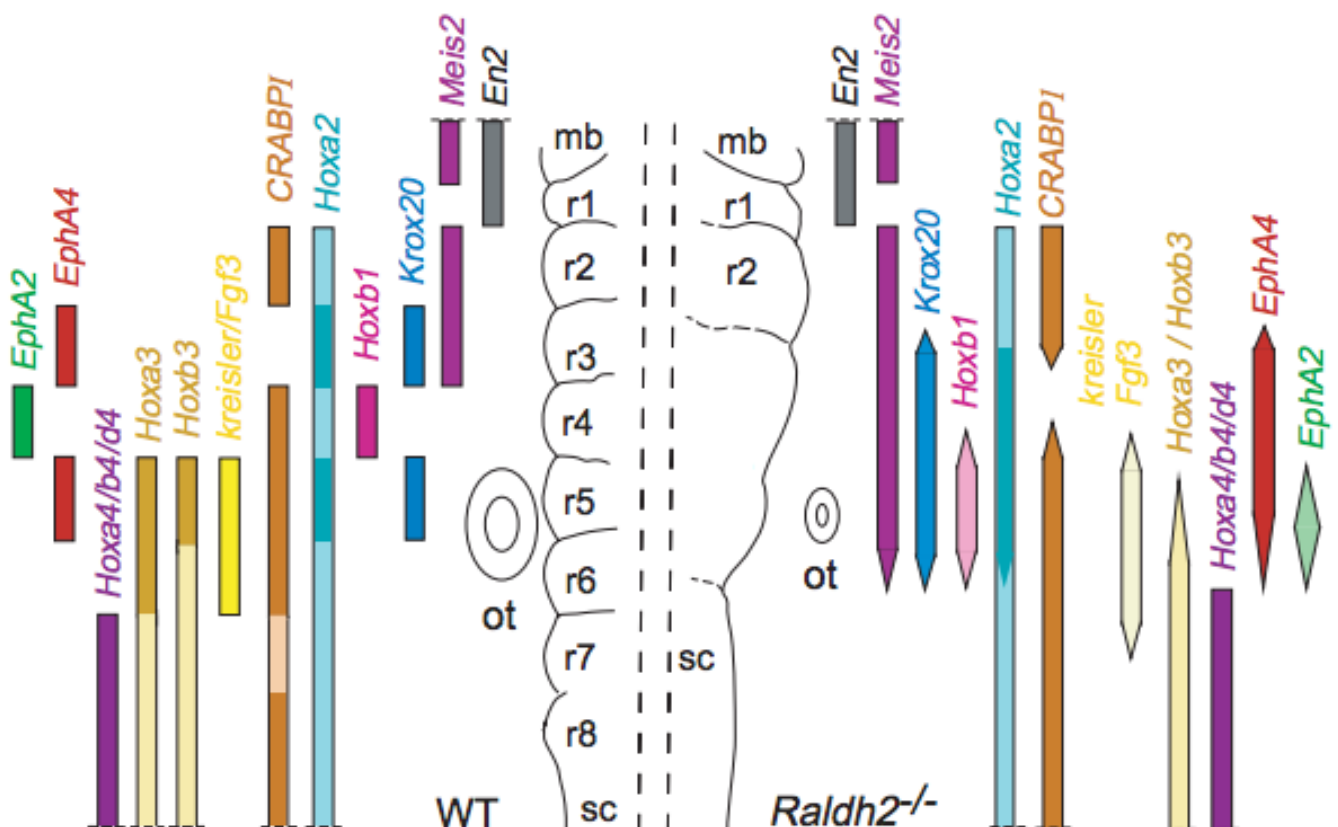


Figure 25. L'AR dans le rhombencéphale

a: localisation spatio-temporelle de l'AR (RA sur le schéma) dans le rhombencéphale. L'expression de l'enzyme de synthèse Raldh2 et la cinétique d'expression des enzymes de dégradation Cyp sont également figurées. E : jours embryonnaires, r : rhombomère. Adapté de Sirbu et al., 2005.

b: représentation schématique de la morphologie d'un rhombencéphale murin à 9,5 jpc et de l'expression génétique de facteurs régionalisés à 8,5 jpc chez des embryons sauvages ou mutants pour l'enzyme de synthèse de l'AR Radh2. L'intensité de la couleur figure le niveau d'expression. mb : midbrain, sc : spinal cord (moelle épinière), ot : vésicule otique, r : rhombomère.

D'après Niederrether et al., 2000.



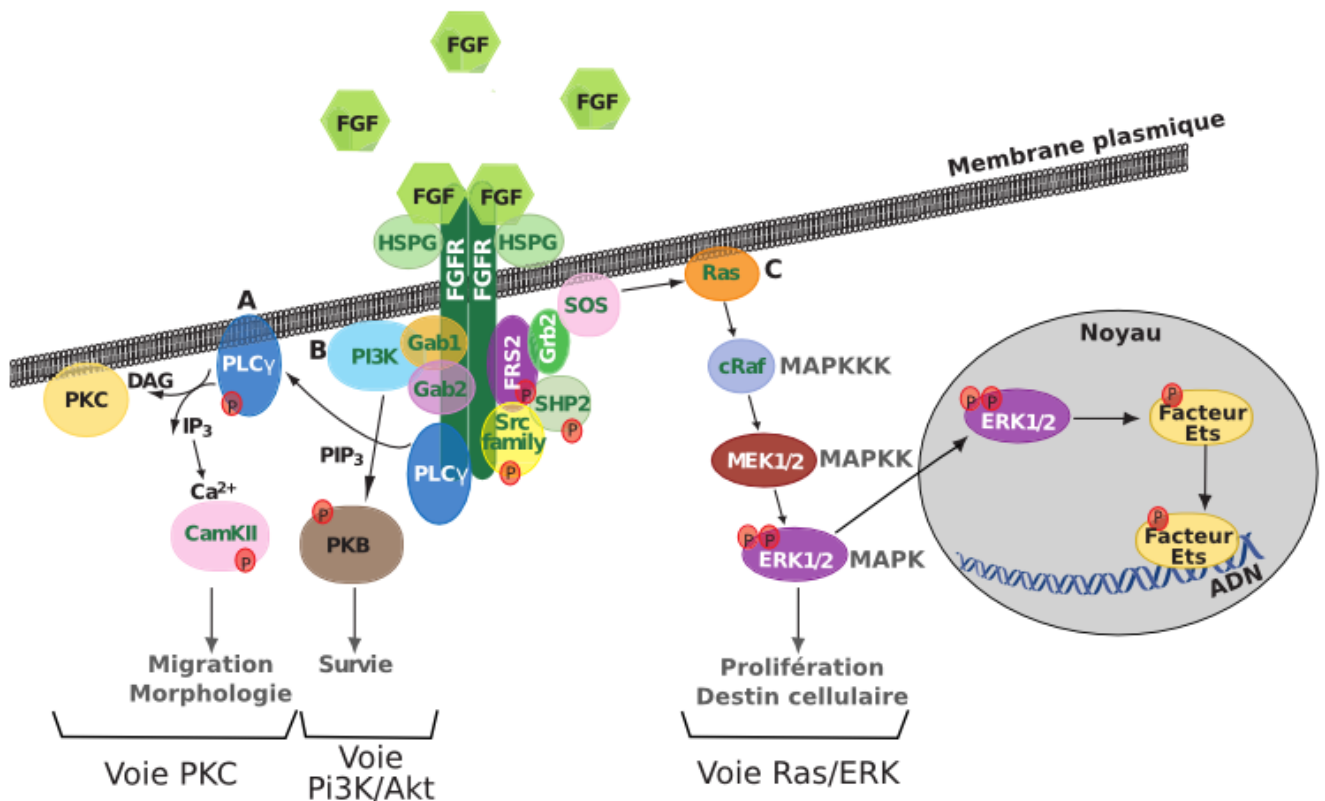


Figure 26. La signalisation FGF et ses voies canoniques de transduction

L'induction du signal FGF est enclenchée par la fixation du ligand au récepteur FGFR qui permet sa dimérisation et la transphosphorylation de résidus tyrosine intracellulaires. Ces résidus phosphorylés vont ensuite être liés par des protéines spécifiques de transduction du signal qui vont activer différentes cascades de signalisation dont la voie PKC (A), la voie PI3K/Akt (B) et la voie Ras/Erk (C).

CamKII : CALcium/calModulin-dependent protein Kinase II; DAG : DiAcylGlycérol; Erk : Extracellular-signal Related Kinase; FGF : Fibroblast Growth Factor; FGFR : FGF Receptor; FRS2 : FGFR substrate 2; Gab : Grb2-Associated protein; Grb2 : Groth factor Receptor-Bound protein 2; HSPG : Heparan Sulphate ProteoGlycan; IP3 : Inositol(1,4,5)-trisPhosphate; MEK : Mitogen-activated protein kinase kinase (également appelé MAP2K); PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase; PIP3 : PhosphatidyInositol(3,4,5)-Phospholipase C gamma; cRaf : v-RAF-leukemia viral oncogene homologue 1 (également appelé RAF1); Ras : Rat Sarcoma; SHP2 : SH2 domaine-containing tyrosine Phosphate 2; SOS : Son Of Sevenless; Src : SaRComa proto-oncogene tyrosine kinase.

Adapté de Dorey and Amaya, 2010.

- la chondrogenèse et le développement squelettique et du cœur (Reifers et al., 2000; Ornitz and Marie, 2002; Dell'Era et al., 2003; Brent and Tabin, 2004; Ornitz, 2005)
- la régionalisation antéro-postérieure de l'embryon à travers d'une part le contrôle des migrations cellulaires responsables de l'élongation de l'axe (Dubrulle and Pourquié, 2004; Bénazéraf et al., 2010) et d'autre part la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la régionalisation AP. C'est ce dernier point que nous allons développer dans ce chapitre, et une partie des travaux présentés dans ce manuscrit traitent de ce sujet dans le contexte de la segmentation du rhombencéphale.

III.4.b)α : Fonctionnement moléculaire de la voie de signalisation FGF

Les FGFs représentent une famille de ligands diffusibles dont 22 membres ont été identifiés chez la souris et l'homme, 13 chez le poulet, 6 chez le xénope, et 10 chez le poisson-zèbre. Ils sont caractérisés par la possession d'un motif conservé de 140 acides aminés et une très forte affinité à l'héparane sulfate (HS). L'HS joue le rôle de co-activateur en augmentant considérablement l'affinité des FGFs pour leur récepteur (pour revue : Dorey and Amaya, 2010). Les FGFs transduisent leur signal en se liant à des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (FGFR). Chez les vertébrés, quatre gènes (FGFR1-4) codent pour ces récepteurs mais des mécanismes d'épissage alternatif ciblant le domaine extracellulaire des FGFRs conduisent à la génération d'un bien plus grand nombre de récepteurs dont les affinités pour leur ligand vont varier (Zhang et al., 2006). Les FGFs se lient par deux à la partie extracellulaire des FGFRs et forment un complexe FGF-FGFR-HS dont la stœchiométrie est 2:2:2 (figure 26). La dimérisation des FGFRs conduit à la transphosphorylation de résidus tyrosine intracellulaires spécifiques et à la transduction du signal à travers principalement l'activation de trois voies cytoplasmiques: la voie Ras/Erk, la voie PI3K/Akt et la voie PKC.

Ces trois voies consistent en des cascades de phosphorylation qui aboutissent à l'activation de FTs. De nombreuses régulations croisées existent entre ces trois voies. La voie PKC est impliquée essentiellement dans les migrations et la morphologie cellulaires. La voie PI3K/Akt joue un rôle dans la survie cellulaire tandis que la voie Ras/Erk est la plus largement utilisée par la signalisation FGF et se retrouve dans de

nombreux processus développementaux. Elle promeut également la prolifération cellulaire. Elle est induite par le recrutement de la protéine SOS au niveau du récepteur FGFR lié à son ligand. SOS va activer la protéine Ras par échange de GTP et cela va conduire aux phosphorylations successives des MAPK Raf, Mek et Erk (figure 26). La double phosphorylation d'Erk mène à sa translocation dans le noyau et à l'activation de FTs, le plus souvent par phosphorylation, les plus connus étant les facteurs Ets (Wasylyk et al., 1993) et plus spécifiquement la sous-famille Pea3 composée des membres Pea3, Erm et Er81.

Le système de signalisation FGF est finement régulé par un ensemble de facteurs modulateurs, induits par les FGFs eux-mêmes, et qui viennent ajuster le signal FGF au niveau approprié pour chaque événement développemental auquel il participe. Ces modulateurs sont susceptibles d'agir aux différentes étapes de la cascade de signalisation et peuvent être transmembranaires et interagir avec les FGFRs, comme FLRT3 et Sef, ou cytoplasmiques comme MPK3 ou les facteurs Sprouty.

III.4.b)β : Les FGFs promeuvent la spécification postérieure de la moelle épinière

Les FGFs produits au niveau du nœud de Hansen vont participer à la spécification d'identité postérieure de la moelle épinière, en coopération avec les FTs Cdx et l'AR dont le gradient dans la moelle est opposé à celui des FGFs (voir figure 27). Les FTs Cdx sont une famille de trois gènes chez les tétrapodes appartenant au complexe ParaHox, paralogue aux clusters des gènes Hox (Ferrier and Holland, 2001). Ils sont exprimés dans la moelle épinière, postérieurement au rhombencéphale, et semblent jouer un rôle déterminant dans l'activation des gènes *Hox* situés en 5' du cluster et l'acquisition de l'identité caudale (Shimizu et al., 2006; Skromne et al., 2007). En effet, des sites de fixation pour les protéines Cdx sont trouvés dans les régions régulatrices de gènes *Hox* postérieurs tels que *Hoxc8*, *Hoxb8* et *Hoxa7* (Subramanian et al., 1995; Taylor et al., 1997; Charité et al., 1998) tandis que l'inactivation combinée des gènes *Cdx1a* et *Cdx4* par morpholinos chez le poisson-zèbre entraîne la mise en place du programme de développement du rhombencéphale postérieur (r4-r7) et de la moelle épinière antérieure en miroir dans la moelle épinière postérieure (figure 27). L'identité postérieure de la moelle épinière, elle, est perdue. Inversement, la surexpression de *Cdx4* dans le rhombencéphale réprime l'expression de marqueurs du rhombencéphale et y induit l'expression de gènes spécifiques de la moelle épinière.

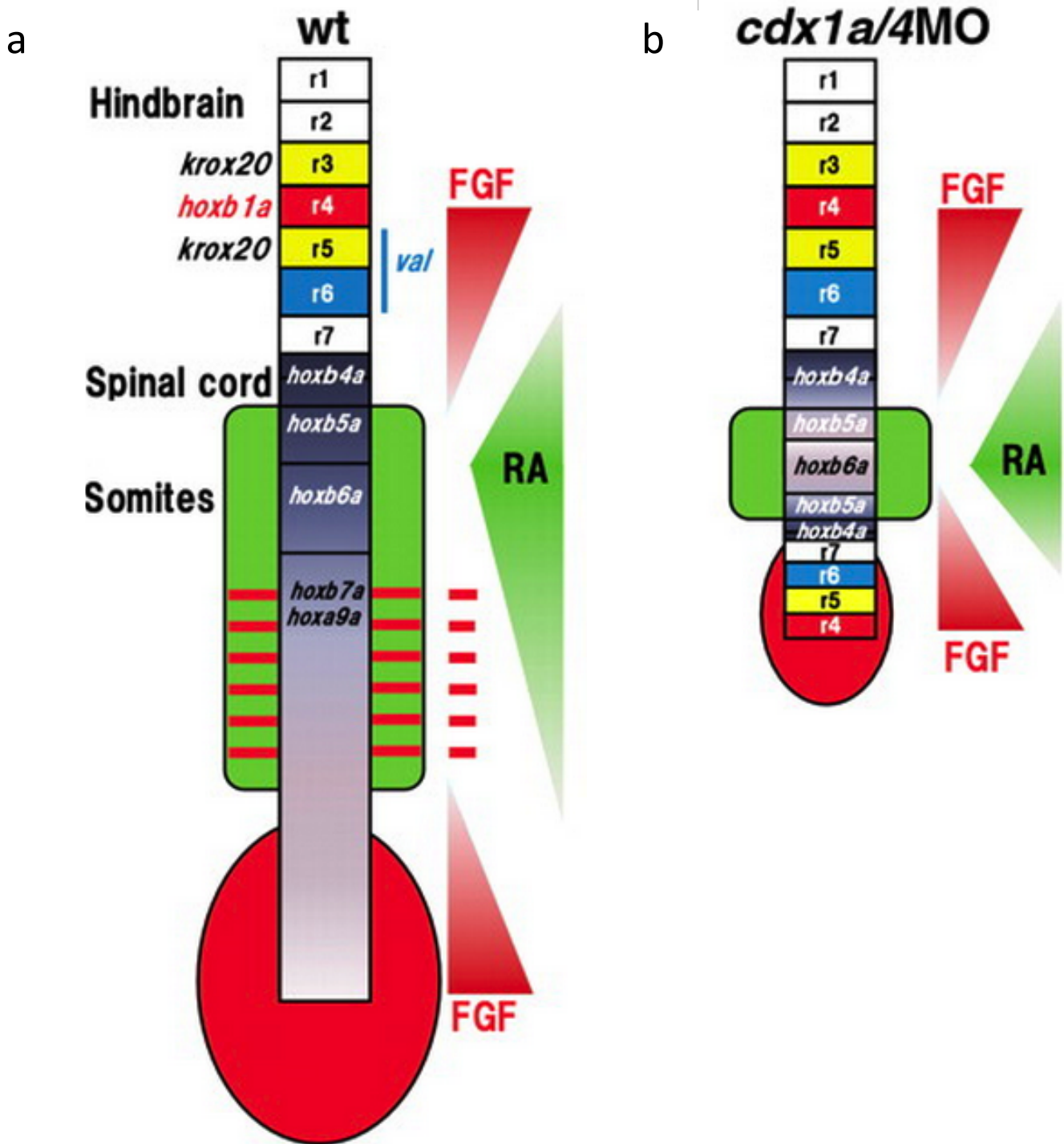


Figure 27. Représentations schématique de l'inactivation des Cdx1a et 4 sur les structures neurales du poisson-zèbre

a: Des gradients opposés d'AR (RA) et de FGF activent les gènes impliqués dans la régionalisation AP du tube neural, dont les *Cdx* dans la moelle épinière qui participent à l'expression des *Hox* dans cette structure.
b: L'inactivation des facteurs Cdx1a et 4 par injection de morpholinos conduit à la duplication en miroir du programme de développement d'identité rhombencéphalique en lieu et place de la moelle épinière postérieure.

D'après Shimizu et al., 2006.

Il a été montré que les FGFs contrôlent l'expression très précoce des *Cdx* dans le mésoderme chez le xénope à travers la voie MAPK (Keenan et al., 2006). De façon intéressante, les gènes *Hox* situés en 5' du cluster sont activés par FGF2 chez le poulet, mais pas ceux situés en 3', qui répondent préférentiellement au signal AR (Bel-Vialar et al., 2002), et cette activation dépend partiellement de la présence des gènes *Cdx*. De même, l'exposition d'explants neuraux cervicaux aviaires à des concentrations croissantes en FGF induit l'expression de gènes *Hox* situés de plus en plus vers l'extrémité 5' du cluster (*Hoxc6* à *Hoxc10*) (Liu et al., 2001). Toutefois, la surexpression des *Hox* postérieurs tels que *Hoxc6a*, *Hoxb7a*, *Hoxa9a* ou *Hoxb9a* ne restaure que partiellement le phénotype provoqué par l'inactivation des *Cdx*, suggérant qu'une partie des fonctions des FTs *Cdx* est indépendante des protéines *Hox*.

III.4.b)χ : Le néocortex est régionalisé par l'action d'un gradient morphogénétique de FGF8

L'ANR, dont nous avons vu qu'il constituait un centre organisateur local secondaire, est une source de FGF8 qui va s'établir en gradient et participer à la régionalisation du cerveau antérieur comme morphogène, c'est-à-dire dont la concentration va conditionner l'activation de programmes développementaux spécifiques (O'Leary et al., 2007; Toyoda et al., 2010; Assimacopoulos et al., 2012). Ainsi chez les souris hypomorphes pour FGF8, les frontières des régions néocorticales sont déplacées antérieurement (Garel et al., 2003). À l'inverse, l'augmentation du signal FGF8 endogène à la source induit la caudalisation des frontières et l'élargissement des régions antérieures au détriment des régions postérieures (Fukuchi-Shimogori and Grove, 2001). Plus fascinant encore, l'introduction d'une seconde source exogène de FGF8 postérieure à la source endogène induit la duplication en miroir de certaines régions du néocortex.

III.4.b)δ : Les FGFs produits au niveau de l'organisateur isthmique organisent le développement de r1 et de la MHB

La frontière mésencéphale-rhombencéphale constitue aussi un centre organisateur local de la régionalisation AP, produisant le facteur FGF8 nécessaire à la mise en place du rhombomère 1 et à l'isthme lui-même. En effet, ces deux structures sont perdues dans le mutant *acerebellar* où le gène codant pour *Fgf8* est muté (Reifers et

al., 1998). Il est aussi suffisant pour les induire : l'implantation de billes de FGF8 dans la région caudale du futur diencéphale ou dans le mésencéphale entraîne un développement isthmo-cérébellaire ectopique autour du lieu d'implantation (Martinez et al., 1999). Plus spécifiquement, FGF8 agit en réprimant l'expression des gènes *Hox* dans r1. En effet, des expériences de gain de fonction, par greffe de billes FGF8 au niveau de r1, aboutissent au déplacement postérieur de la frontière d'expression de *Hoxa2*. Inversement, cette frontière est déplacée antérieurement suite à la perte de fonction symétrique effectuée par l'utilisation d'une bille sur laquelle un anticorps spécifique de FGF8 a été préalablement adsorbé (figure 28, Irving and Mason, 2000). Il est ainsi proposé que la signalisation AR orchestre le développement du rhombencéphale postérieur, via l'activation des gènes *Hox*, tandis que la signalisation FGF en provenance de l'isthme dirige l'établissement du rhombencéphale rostral en réprimant l'activation des *Hox* antérieurement à r2 et en activant d'autres gènes, comme *Gbx2* (Rhinn et al., 2003).

III.4.b)ε : Les FGFs produits au niveau de r4 participent à la segmentation du rhombencéphale

Comme nous l'avons vu précédemment, le rhombomère 4 a été décrit chez plusieurs organismes comme une source de signaux FGF organisant la régionalisation AP des territoires adjacents. Contrairement à r1, la signalisation FGF possède ici une action activatrice vis-à-vis de certains gènes *Hox*, comme *Hoxb3* dans r5 via un site de fixation aux facteurs ETS (Manzanares et al., 1997). Chez le poisson-zèbre, *Fgf3* et *Fgf8* sont exprimés précocement dans le pré-rhombomère 4 (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002). Chez le poulet, *Fgf3* est exprimé dans les territoires présomptifs r4-r6 et les acteurs de la cascade Ras/Erk ainsi que les cibles effectrices Erm et Pea3 sont présents dans le rhombencéphale (Weisinger et al., 2010). Cette étude montre également que FGF3 et le facteur Pea3 sont nécessaires à l'expression de *Krox20* dans r3 et r5. Parallèlement, plusieurs travaux chez le poisson suggèrent que les signaux FGF3 et FGF8 produits par r4 sont nécessaires à la spécification des territoires adjacents où ils induisent l'expression de *Krox20* et *MafB* (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wielllette and Sive, 2004). De façon intéressante, bien que FGF8 ne soit pas détecté dans le rhombencéphale murin et aviaire, son mécanisme d'action semble conservé. En effet, la greffe de billes FGF8 ou FGF4 sur un embryon de poulet au niveau du premier somite

Figure 28. Les FGFs produits par l'isthme contrôlent le positionnement de la frontière antérieure d'expression de *Hoxa2*

a: l'implantation d'une bille de FGF (tête de flèche) au niveau de la frontière r1/r2 induit la répression de l'expression de *Hoxa2* dans r2 visualisée par hybridation in situ (en bleu). Les transcrits *Fgf8* sont en rouge.

b: l'implantation d'une bille d'anticorps anti-FGF8 produit l'effet inverse et entraîne l'expansion rostrale de l'expression de *Hoxa2*.

Adapté de Irving and Mason, 2000

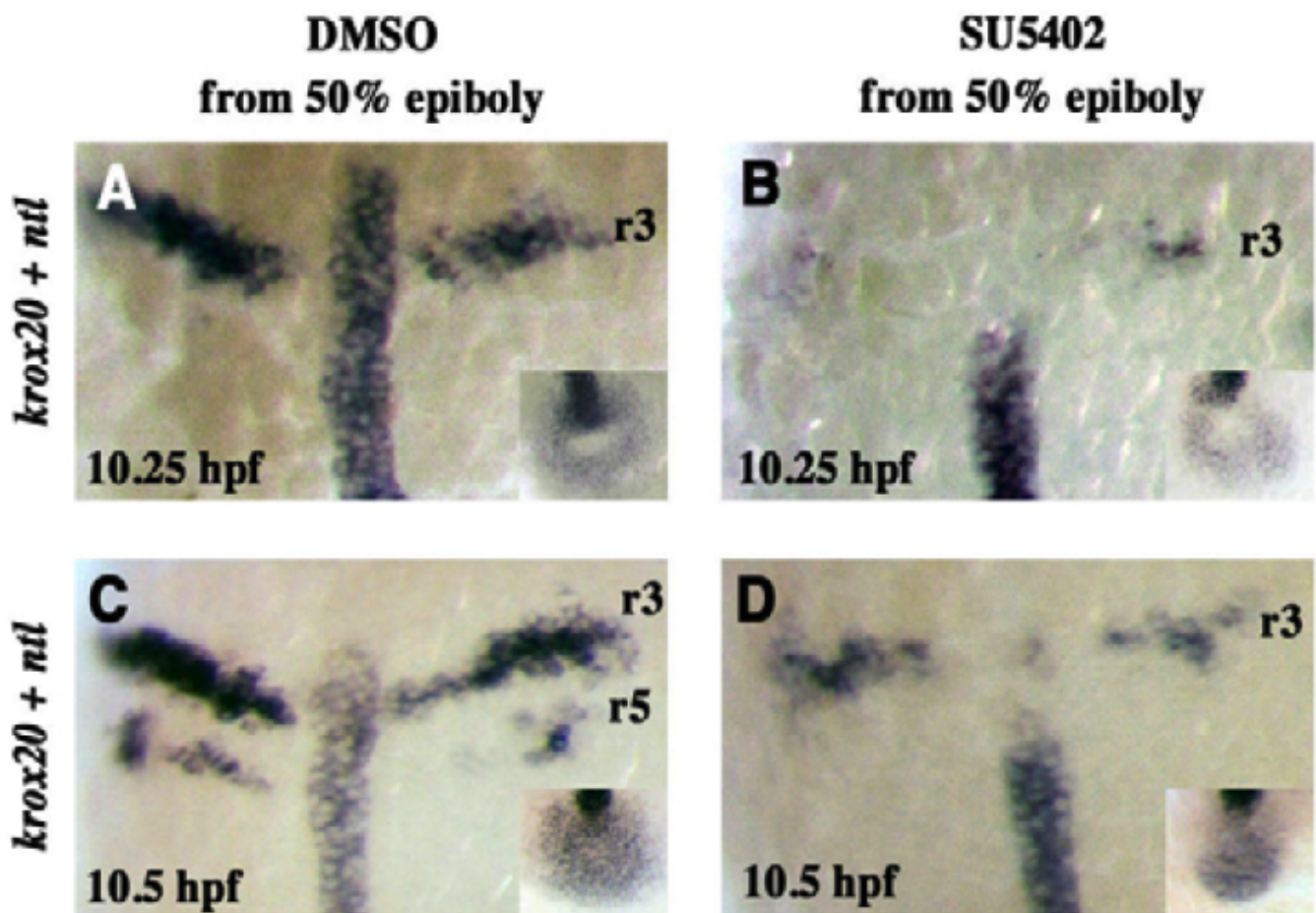
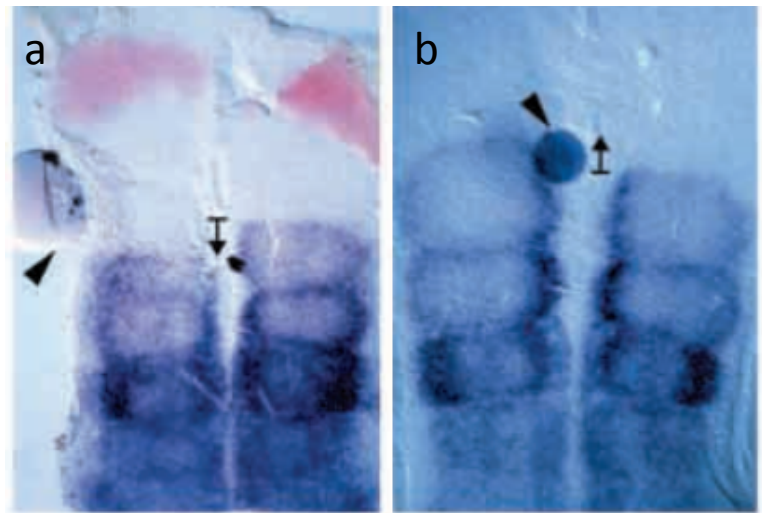


Figure 29. La signalisation FGF contrôle le démarrage de l'expression de *Krox20*

Des embryons de poisson-zèbre ont été incubés à partir du stade 50% épiboly dans une solution contrôle (A,C) ou avec l'inhibiteur des FGFs SU5402 (B,D). L'observation de ces embryons à 10,25 (A,B) ou à 10,5 hpf (C,D) heures post fécondation (hpf) montre que l'expression de *Krox20*, visualisée par hybridation in situ, dans r3 et r5 est retardée quand la signalisation FGF est inhibée. L'expression du gène *notail (ntl)* qui marque la notochorde est utilisée pour déterminer le stade des embryons, le traitement inhibiteur aux FGFs pouvant ralentir le développement.

D'après Labalette et al., 2011.

conduit à l'extension postérieure des domaines d'expression de *Krox20* et *MafB* (Marín and Charnay, 2000). À l'inverse, un traitement inhibiteur aux FGFs entraîne la répression transcriptionnelle de ces deux gènes, plus marquée dans r5 que r3 pour *Krox20*. Récemment, nous avons montré au laboratoire que la modulation du signal FGF dans le rhombencéphale par les *Sprouty* contrôlait le démarrage de l'expression de *Krox20* ainsi que la taille finale des rhombomères 3 et 5 (figure 29, Labalette et al., 2011). Dans r5, ce contrôle par les FGFs semble intervenir à travers la fixation directe du facteur MafB sur un élément régulateur de *Krox20*. L'étude du mécanisme d'action des FGFs régissant la régulation de *Krox20* dans r3 fait partie des travaux présentés dans ce manuscrit.

III.4.c) Implication potentielle de la voie Wnt

Nous avons déjà vu que la voie de signalisation Wnt joue un rôle précoce dans la postériorisation de la plaque neurale, peu après ou concurremment à son induction. Les Wnt interviennent également dans la spécification du rhombencéphale, en régulant directement les facteurs *Meis3* et *Gbx2* (Li et al., 2009; Elkouby et al., 2010). L'intervention de la voie Wnt dans le processus de régionalisation du rhombencéphale n'est, elle, pas clairement établie mais plusieurs données suggèrent une implication potentielle. Par exemple, le facteur *Wnt8c* est exprimé dans la plaque neurale chez le poulet à HH7 et se restreint à r4 aux stades HH8 et HH9 (Hume and Dodd, 1993). Cette expression dans r4 est conservée chez la souris (*Wnt3a*) (Niederreither et al., 2000). De même, un des effecteurs transcriptionnels de la voie Wnt, le gène *Tcf-4*, est exprimé dans r3 et r5 chez la souris (Cho and Dressler, 1998) tandis que le facteur *Tbx10*, décrit comme co-effecteur des Wnt dans d'autres systèmes, est exprimé dans r4 et r6 (Xue et al., 2010). Chez le poulet, *Wnt3A*, en collaboration avec FGF8, est capable d'induire l'expression de *Krox20* sur des explants de neuroectoderme en culture prélevés en fin de gastrulation (Nordström et al., 2002) tandis qu'il a été montré *in vivo* chez le xénope que *Hoxd1* et *Irx3* étaient activés directement par la voie Wnt (Janssens et al., 2010).

En plus de rôles indépendants, les trois voies de signalisation décrites sont liées entre elles par des actions synergiques ou antagonistes qui permettent un contrôle spatio-temporel précis du processus de segmentation. Par exemple, le territoire

d'expression de *Wnt8a* est étendu chez les mutants murins *Sprouty1-Sprouty2*, chez qui le signal FGF est augmenté (Rogers et al., 2011), tandis que les signaux FGF et Wnt sont capables ensemble de réprimer l'expression de l'enzyme de dégradation de l'AR Cyp26 (Kudoh et al., 2002).

III.5 Gènes de segmentation et autres acteurs majeurs participant à la mise en place des rhombomères

La morphogénèse du rhombencéphale est amorcée par l'établissement des gradients de facteurs décrits précédemment. Ces voies de signalisation contrôlent un ensemble de FTs dont l'action concertée avec les molécules diffusibles aboutit au final à la mise en place des deux systèmes moléculaires que sont le code *Hox*, spécifiant l'identité AP des segments, et les Eph-ephrines, responsables de la ségrégation cellulaire.

Ces FTs organisent la segmentation du rhombencéphale en affinant l'information contenue dans les gradients et sont le plus souvent nécessaires à la formation d'un ou plusieurs rhombomères. Ils sont définis pour cette raison comme des gènes de segmentation, bien que cela ne leur exclue pas un rôle dans la spécification de l'identité AP des segments. D'autres facteurs n'étant pas formellement des gènes de segmentation mais participant de façon centrale au processus de segmentation sont également décrits dans ce chapitre.

III.5.a) Les gènes *Hox* des groupes paralogs 1 et 2

Nous avons déjà détaillé le rôle des gènes *Hox* dans la spécification AP des rhombomères. Les *Hox* des groupes 1 et 2 sont également impliqués précocement dans la mise en place des segments du rhombencéphale comme en témoignent les double mutants *Hoxa1-Hoxb1* et *Hoxa2-Hoxb2* chez la souris ou le triple mutant *Hoxa1-hoxb1-Hoxd1* chez le xénope, chez lesquels plusieurs segments sont perdus ou réduits.

Les gènes *Hox* PG1 sont les premiers à être exprimés dans le rhombencéphale et leurs domaines d'expression s'établissent autour de 7,5-8 jpc chez la souris, soit un jour avant la formation morphologique des rhombomères, et s'étendent jusqu'à une frontière antérieure située entre les futurs r3 et r4. L'expression de *Hoxb1* est ensuite maintenue

dans r4 par une boucle d'autorégulation (Pöpperl et al., 1995) tandis que celle de *Hoxa1* s'éteint (Murphy and Hill, 1991). *Hoxd1* n'a pas été détecté dans le rhombencéphale des mammifères jusqu'à ce jour. En revanche, chez le xénope, *Hoxd1* est exprimé de façon très transitoire dans des territoires chevauchant les domaines *Hoxb1* et *Hoxa1* (Kolm & Sive, 1995; McNulty & al., 2005). Chez le poisson-zèbre, il n'y a pas de gène *Hoxd1* et les profils d'expression et différents travaux de gains et de pertes de fonction suggèrent que les gènes ichthyens *hoxb1b* et *hoxb1a* sont les équivalents fonctionnels respectifs de *Hoxa1* et *Hoxb1* murins (Jozefowicz et al., 2003).

Les phénotypes associés aux pertes de fonction des gènes Hox PG1 démontrent un rôle excédant la seule spécification d'identité AP (figure 30), en particulier pour *Hoxa1*. En effet, les mutants murins *Hoxa1* possèdent un rhombomère 4 réduit et un rhombomère 5 absent ou sévèrement diminué suivant les études (Chisaka et al., 1992; Carpenter et al., 1993; Mark et al., 1993). Dans ces mutants, la frontière antérieure d'expression de *Hoxb1* est également plus caudale et le territoire d'expression de *Krox20* dans r3 est plus grand (Rossel and Capecchi, 1999).

Les gains ou pertes de fonction pour *Hoxb1* sont associés à des transformations homéotiques plus classiques pour des gènes *Hox* : dans le mutant *Hoxb1* les marqueurs spécifiques de r4 sont perdus au profit de l'expression de marqueurs de r2 (Goddard et al., 1996; Studer et al., 1996); tandis que le phénotype inverse est observé dans le cas d'une expression ectopique de *Hoxb1* ciblée à r2 (Bell et al., 1999). De façon cohérente avec le rôle régulateur de *Hoxa1* sur *Hoxb1*, la surexpression de *Hoxa1* chez la souris induit l'expression ectopique de *Hoxb1* dans r2 et l'acquisition d'une identité de type r4 par les populations neuronales de ce rhombomère (Zhang et al., 1994).

Hoxb1 est probablement aussi impliqué dans le processus de mise en place des territoires car la double mutation *Hoxa1-Hoxb1* produit un phénotype de défaut de segmentation plus important que le simple mutant *Hoxa1* : les rhombomères 4 et 5 disparaissent complètement, l'expression de MafB dans r6 est diminuée tandis que celle de *Krox20* dans r3 est à la fois plus faible et plus étendue, occupant un territoire grand comme deux rhombomères avant qu'un important processus d'apoptose ne réduise celui-ci à la taille d'un seul rhombomère et ne produise un rhombencéphale globalement plus petit (Studer et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999). Les mutants *Hoxa1* possédant un seul allèle *Hoxb1* fonctionnel montrent un phénotype intermédiaire.

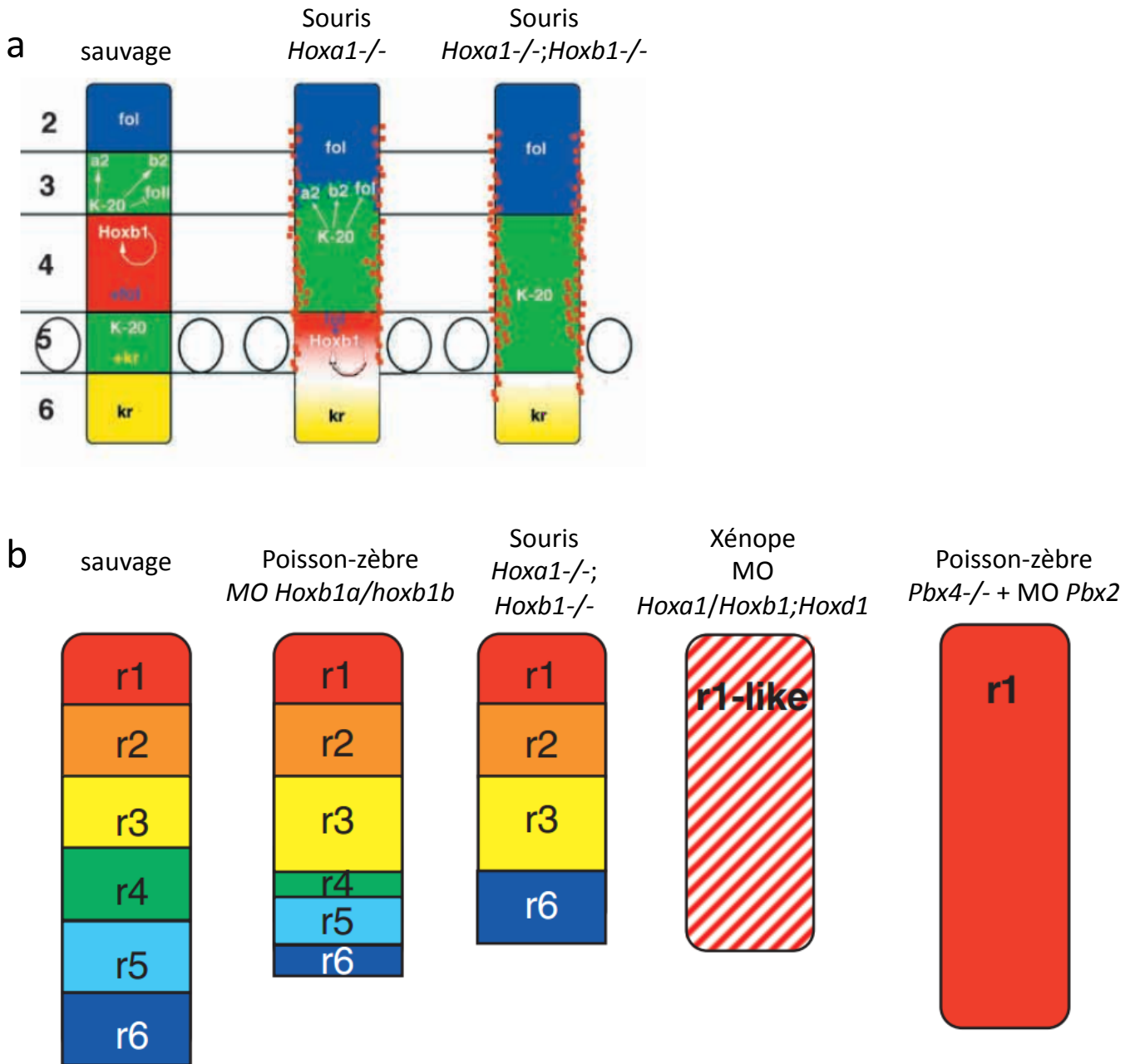


Figure 30. Conséquences de la perte de fonction des gènes Hox PG1 sur la segmentation du rhombencéphale

a: Représentation schématique de l'expression génétique et de l'organisation du rhombencéphale (r2 à r6) dans des embryons murins à 8-8,5 jpc sauvage ou mutants. L'ellipse au niveau de r5 symbolise la vésicule otique.

fol: *follistatine*; a2: *Hoxa2*; b2: *Hoxb2*; K-20: *Krox20*; kr: *MafB*.

D'après Rossel and Capecchi, 1999.

b: Représentation schématique de la segmentation du rhombencéphale chez différents modèles de vertébrés au sein desquels la fonction des gènes Hox PG1 est altérée. Le triple knock-down chez le xénope de *Hoxa1/Hoxb1/Hoxd1* et l'inactivation de tous les cofacteurs Pbx des protéines Hox conduisent à une perte complète des gènes à expression segmentée dans les rhombomères 2 à 6.

MO : morpholinos; r : rhombomères.

D'après McNulty et al., 2005.

Chez le poisson-zèbre, les expériences de gains de fonction de *hoxb1b* (équivalent *Hoxa1*) et *hoxb1a* (équivalent *Hoxb1*) provoquent la transformation caudalisante de r2 en r4, similairement à ce qui est observé chez la souris (McClintock et al., 2001). De même, l'organisation neuronale du rhombomère 4 mime celle de r2 chez des poissons injectés avec un morpholino contre *hoxb1a* (McClintock et al., 2002). La perte de fonction *hoxb1b* produit un phénotype semblable au mutant murin *Hoxb1a* mais moins dramatique : r5 n'est pas perdu, en revanche les territoires r4-r6 sont réduits et r3 est étendu caudalement (McClintock et al., 2002). Le double K.O. *hoxb1b-hoxb1a* par injection de morpholinos accentue ce phénotype mais est également moins prononcé que le double mutant murin *Hoxa1-Hoxb1* (figure 30, McClintock et al., 2002). De façon intéressante, les gènes *Hox* PG1 pourraient être à l'origine du signal FGF dans r4 (Waskiewicz et al., 2002b). En effet, la surexpression ectopique de *hoxb1a* par injection d'ARN sur des embryons à 1 cellule entraîne l'expansion rostrale et caudale de l'expression de *fgf3*, normalement restreint à r4. Cette expression est au contraire réduite dans les embryons injectés avec des morpholinos dirigés contre *hoxb1a* et *hoxb1b*.

Enfin, chez le xénope, l'inactivation, par injection de morpholinos, de chacun des trois gènes du groupe PG1 exprimés dans le rhombencéphale n'aboutit qu'à de faibles perturbations de la segmentation, touchant essentiellement r4 (McNulty et al., 2005). La combinaison de deux pertes de fonction accentue le phénotype mais l'expression de *Krox20* dans r3 et r5 est maintenue. En revanche, l'inactivation des trois gènes *Hoxa1-Hoxb1-Hoxd1* entraîne une absence complète de segmentation et une perte des marqueurs propres aux régions r2-r7, incluant les gènes *Hox* PG2 à 4 et *Krox20*, ainsi qu'une extension postérieure du domaine d'expression de *Gbx2*, indiquant que le rhombencéphale acquiert une seule identité de type r1 (McNulty et al., 2005). Le phénotype plus grave du triple mutant chez le xénope, en regard du double mutant chez la souris ou le poisson, n'est pas expliqué à ce jour et suggère que *Hoxd1* s'exprime peut-être dans le rhombencéphale murin et ichthyen de façon faible et transitoire, comme chez le xénope, et que cette expression n'a pas été détectée. Il est également possible qu'un autre *Hox* chez la souris et le poisson joue le rôle de *Hoxd1* chez le xénope.

L'AR est le principal régulateur précoce caractérisé des gènes *Hox* PG1 et agit par l'intermédiaire de deux sites RAREs situés en aval des gènes *Hoxa1* et *Hoxb1* (Marshall et al., 1994; Frasch et al., 1995; Langston and Gudas, 1992). Leur mutation conduit à des

phénotypes assez similaires aux mutants simples *Hoxa1* et *Hoxb1* (Dupé et al., 1997; Gavalas et al., 1998; Studer et al., 1998). En plus de la boucle d'autorégulation, l'expression de *Hoxb1* est également contrôlée par *Hoxa1* en synergie avec des facteurs Oct et Sox (Di Rocco et al., 2001), les régulations croisées ou autologues étant fréquemment rencontrées chez les gènes *Hox*.

Les gènes Hox PG2 sont exprimés après ceux du groupe 1, à partir de 8-8,5 jpc. *Hoxa2* est le gène Hox dont le profil d'expression est le plus antérieur puisqu'il s'étend jusqu'à la frontière r1/r2 et est le seul gène Hox exprimé dans le rhombomère 2 (Krumlauf, 1993; Prince and Lumsden, 1994). *Hoxb2* est exprimé postérieurement à la limite r3/r4 et de façon plus intense dans r3-r5 (Krumlauf, 1993). Ces expressions sont conservées chez la souris, le poulet, le xénope et le poisson de r2 à r5 (Pasqualetti et al., 2000; Hunter and Prince, 2002). Postérieurement, *Hoxa2* et *Hoxb2* sont exprimés faiblement chez la souris, le poulet et le xénope mais pas chez le poisson.

Le phénotype du mutant murin *Hoxa2* suggère une implication de ce dernier dans le processus de mise en place des territoires. La frontière r1/r2 est absente et les territoires r2 et r3 sont réduits au profit de r1, ce qui entraîne un élargissement du cervelet et un rétrécissement du pons (Gavalas et al., 1997; Davenne et al., 1999; Barrow et al., 2000). Des défauts de spécification AP sont également observés avec le remplacement des structures du second arc branchial (colonisé par les cellules de la CN issues de r4) par la duplication en miroir des structures du premier arc (normalement colonisé par les cellules de la CN de r2), ce qui suggère une altération de l'identité de r4 (Gendron-Maguire et al., 1993; Rijli et al., 1993). L'expression ectopique antérieure de *Hoxa2* chez le poulet ou le xénope conduit à l'inverse au remplacement du premier arc branchial par des structures du second arc (Grammatopoulos et al., 2000; Pasqualetti et al., 2000).

Le mutant murin *Hoxb2* ne montre pas de défaut de segmentation (Barrow and Capecchi, 1996; Davenne et al., 1999). Toutefois, l'expression de *Hoxb1* dans r4 y est abolie (observé seulement dans l'étude de Barrow et Capecchi) et les neurones somatiques du nerf facial VII (en regard de r4) ne se forment pas, ce qui est associé à une paralysie faciale observée également chez le mutant *Hoxb1*. Dans le double mutant *Hoxa2-Hoxb2*, les frontières inter-rhombomériques entre r1 et r4 sont absentes, ce qui suggère que les deux gènes coopèrent pour l'établissement de la limite r2/r3, et la

réduction du territoire r2/r3 au profit de r1 est accentuée. L'expression des gènes *Krox20* ou *Epha4* dans r3 est cependant toujours segmentée (Davenne et al., 1999).

Malgré la conservation d'expression, les pertes de fonction de *Hoxa2a* et *Hoxb2a* chez le poisson-zèbre ne sont pas associées à des défauts de segmentation. La perte de fonction d'un seul gène ne produit aucun phénotype (Hunter and Prince, 2002) tandis que la combinaison du K.O. des deux gènes est associée à des phénotypes seulement liés à la spécification AP.

L'expression de *Hoxa2* et *Hoxb2* est contrôlée directement par *Hoxb1* dans r4 (Maconochie et al., 1997; Jacobs et al., 1999; Ferretti et al., 2000b; Tümpel et al., 2007) et par *Krox20* dans r3 et r5 (Sham et al., 1993; Nonchev et al., 1996; Vesque et al., 1996; Maconochie et al., 2001) ainsi que par des boucles d'auto- et d'inter-régulation. L'expression de *Hoxa2* dans r2 est contrôlée par un enhancer spécifique localisé dans le second exon du gène (Frasch et al., 1995; Tümpel et al., 2008) dont l'activité requiert la présence de deux sites de fixation aux protéines Sox.

III.3.b) Les cofacteurs des gènes *Hox* : les gènes *Pbx* et *Meis/Prep*

La similitude des domaines de liaison à l'ADN des différentes protéines Hox ainsi que leurs territoires d'expression chevauchants impliquent que des co-facteurs sont nécessaires pour leur conférer une spécificité d'action vis-à-vis de leurs cibles. Dans le rhombencéphale, les protéines des familles Pbx et Meis/Prep, orthologues des gènes *Extradenticle* et *homothorax* chez la drosophile, jouent ce rôle en formant des complexes trimériques avec les *Hox* (Jacobs et al., 1999; Vlachakis et al., 2000). Le rôle direct des Pbx et Meis dans la médiation de la régulation par les Hox a été démontré dans le contrôle de l'expression des gènes *Hoxb1*, *Hoxa2* et *Hoxb2* dans r4, où ils interviennent dans l'établissement de boucles d'autorégulation (Tümpel et al., 2007), et plus récemment dans la régulation de l'expression de *Krox20* (Wassef et al., 2008).

Les facteurs Prep et Meis présentent des profils d'expression ubiquitaires dans le rhombencéphale. En revanche, les gènes *Meis* sont exprimés avant la segmentation du rhombencéphale selon des territoires dont les limites antérieures chez le poisson-zèbre correspondent aux futures frontières r2/r3 pour *meis1.1*, r3/r4 pour *meis2.2* et *meis3.1* tandis que *meis2.1* est fortement exprimé dans r2 et r3 au stade 6 somites (Ferretti et al., 2000; Waskiewicz et al., 2001; Zerucha and Prince, 2001; Choe et al., 2002). Chez la

souris également, les profils d'expression des Meis dans le rhombencéphale sont restreints et dynamiques (Wassef et al., 2008).

Conformément à ce qui est attendu au vu du rôle de cofacteur des Pbx, le mutant *lazarus* caractérisé par l'élimination constitutive de l'expression de *Pbx4* aboutit à un défaut de régionalisation AP mimant l'inactivation de plusieurs gènes *Hox* (Pöpperl et al., 2000). Les frontières inter-rhombomériques sont absentes antérieurement à r4 comme dans le double mutant *Hoxa2-Hoxb2* (Davenne et al., 1999); les arcs branchiaux 1 et 2 sont fusionnés, ce qui est observé parfois chez le mutant *Hoxa2* (Rijli et al., 1998) et les motoneurons du nerf facial (VII) ne migrent pas postérieurement à r4, ce qui est caractéristique du mutant *Hoxb1* (Studer et al., 1996). L'expression de *Hoxb1* dans r4 et de *Hoxa2* et *Hoxb2* dans r3-r5 n'est pas renforcée et celle de *Krox20* est affaiblie dans r3. De manière intéressante, le phénotype est partiellement sauvé par la surexpression des protéines Meis, qui se fixent sur les protéines Pbx4 maternelles et les stabilisent (Waskiewicz et al., 2001).

L'élimination de toute activité Pbx chez le poisson-zèbre, par injection de morpholinos contre Pbx2 au sein du mutant *lazarus* (*Pbx4*) produit un phénotype nettement plus dramatique (Waskiewicz et al., 2002). Aucune frontière inter-rhombomérique n'est formée, les populations neuronales sont homogènes le long de l'axe AP et l'expression de *krox20*, *mafB*, *vHnf1*, *hoxb1a* et *hoxb2* est absente ou sévèrement réduite. En fait, le rhombencéphale entier acquiert une identité de type r1, dans lequel aucun gène *Hox* n'est exprimé, caractérisée par l'expression du gène *fgfr3* et l'incapacité des cellules à contribuer aux rhombomères 2 à 6 d'un embryon sauvage au sein duquel elles sont greffées.

De même, toujours chez le poisson-zèbre, la perturbation de l'activité des protéines Meis/Prep, par injection de morpholino ou d'ARNm codant pour des dominants négatifs, conduit également à une désorganisation de la segmentation du rhombencéphale dans sa partie centrale, caractérisée par la diminution importante de l'expression de *krox20* dans r3 ou des marqueurs antérieurs *hoxb1a*, *hoxa2* et *hoxb2* (Vlachakis et al., 2001; Waskiewicz et al., 2001; Choe et al., 2002; Deflorian et al., 2004). Inversement, la surexpression combinée des gènes *Hox*, *Pbx* et *Meis/Prep* induit l'expression ectopique massive des marqueurs rhombencéphaliques *Hoxb1*, *Krox20*, *MafB* et *vHnf1* dans le tube neural antérieur ichthyen ou aviaire (Vlachakis et al., 2001; Choe et al., 2002; Wassef et al., 2008).

Les protéines Pbx forment des hétérodimères avec les Hox qui se fixent de manière coopérative sur des sites bipartites d'ADN, augmentant par ce biais leur affinité et leur spécificité de liaison à l'ADN. L'interaction induit également un changement conformationnel des Hox qui entraîne le contact de nouveaux acides aminés avec l'ADN. Ce changement étend le site de reconnaissance à l'ADN de la protéine, initialement limité à l'homéoboîte dont le motif est relativement simple : TAATNN (Mann et al., 2009). Les protéines Meis/Prep stabilisent le complexe Hox/Pbx sur l'ADN en se fixant sur une séquence distante (Moens and Selleri, 2006). La translocation nucléaire des Meis/Prep requiert l'interaction avec les Pbx via un domaine protéique spécifique (Choe et al., 2002), illustrant l'interdépendance étroite entre ces deux familles de facteurs.

Enfin, les protéines Pbx et Meis/Prep sont également capables d'agir de façon indépendante des Hox (Aamar and Frank, 2004; Laurent et al., 2008). Par exemple, il semble que *Meis3* pourrait être impliqué dans l'établissement du centre signalisateur localisé dans r4 via l'induction de l'expression des gènes *Fgf3* et *Fgf8*.

III.5.c) Les gènes *Irx*

Les gènes *Irx* sont les homologues des gènes *Iroquois* de *Drosophile* qui interviennent dans la régionalisation de l'œil, de la tête et du mésothorax, et appartiennent à la superfamille des TALE, comme les *Pbx* et les *Meis/Prep*, dont nous avons déjà décrit le rôle de cofacteurs des *Hox*. 6 gènes sont répartis en deux clusters chez les mammifères : les gènes *Irx1*, *Irx2* et *Irx4* se trouvent sur le cluster *IrxA* et les gènes *Irx3*, *Irx5* et *Irx6* sur le cluster *IrxB*. Chez le poulet, les gènes *Irx1* et *Irx2* sont exprimés dans r1 (Goriely et al., 1999; Cheng et al., 2001) et *Irx2*, en synergie avec le signal FGF8 provenant de l'isthme, est nécessaire à la formation du cervelet notamment en activant l'expression de *Gbx2* (Matsumoto et al., 2004). Des études chez la souris (Houweling et al., 2001) et le poisson-zèbre (Lecaudey et al., 2005) qui compte 11 gènes *Irx* montrent que ceux-ci sont très largement exprimés dans le rhombencéphale. Chez ces espèces également, les gènes *Irx* sont impliqués dans la formation de l'extrémité antérieure du rhombencéphale (Itoh et al., 2002; Anselme et al., 2007). De façon intéressante, les gènes *Irx7* et *Irx7b* sont exprimés précocement chez le poisson-zèbre dans la partie antérieure du rhombencéphale jusque la frontière r4/r5 (Lecaudey et al., 2001; Itoh et al., 2002). *Irx7* participe à l'établissement de la frontière r4/r5 à travers un mécanisme de répression mutuelle avec *vHNF1* exprimé postérieurement (Lecaudey et

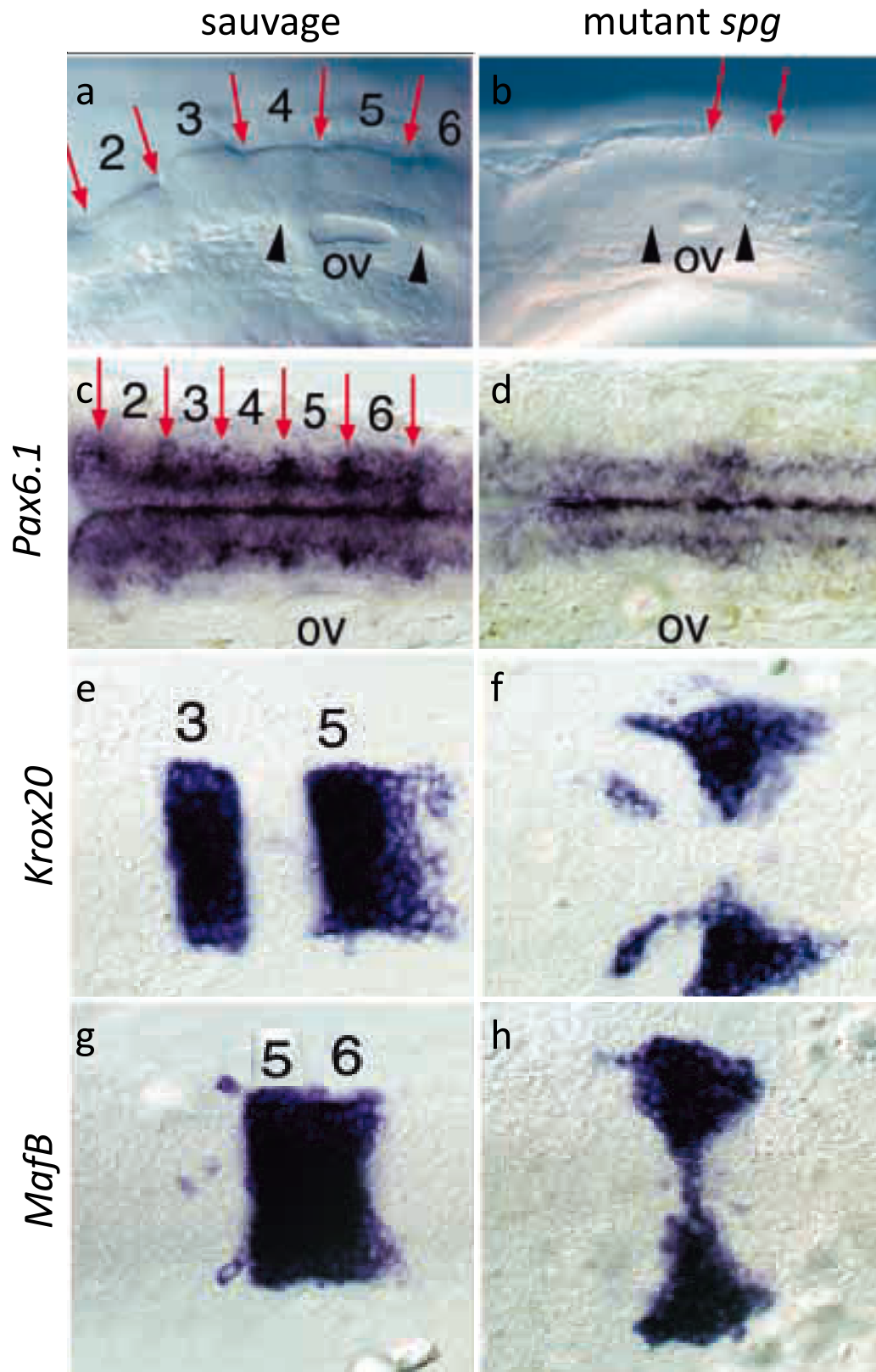


Figure 31. Perturbations de la segmentation du rhombencéphale dans le mutant *spg*

La formation des rhombomères et des frontières inter-rhombomériques est sévèrement perturbée dans le mutant *spg* (a-d). Vues latérales (a,b) et vues dorsales (c,d) d'embryons à 22 ss. Les flèches rouges indiquent la position des frontières des rhombomères et les têtes de flèches noires la taille de la vésicule otique (ov). L'expression du gène *Pax6.1* suivie par hybridation in situ (c,d) permet de visualiser les frontières.

L'expression des gènes de segmentation est également affectée (e-h). Vues dorsales d'embryons à 5 ss après hybridation in situ contre *Krox20* (e,f) ou *MafB* (g,h).

ss : stade somitique

Extrait de Hauptmann et al., 2002

al., 2004) et son inactivation entraîne une expansion antérieure du territoire r5 exprimant *Krox20*. De plus, *Irx7* et *Irx7b* sont nécessaires à l'initiation de l'expression de *Krox20* dans r3 et à l'expression des différents marqueurs de la région r2-r4 (Stedman et al., 2009). Ils sont également capables d'induire ceux-ci de façon ectopique par surexpression avec les facteurs Meis.

L'AR et la voie Wnt sont impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes *Irx* (Gómez-Skarmeta et al., 1998; Gómez-Skarmeta and Modolell, 2002; Itoh et al., 2002; Lecaudey et al., 2004).

III.5.d) Le gène *Pou2/Pou5f1/Oct3-4*

Les gènes Pou sont des FTs caractérisés par un domaine conservé et bipartite de liaison à l'ADN constitué d'une sous-unité N-terminale dite Pou-spécifique et d'un homéodomaine C-terminal. Les facteurs Pou jouent des rôles importants dans de nombreux aspects du développement comme la formation du cerveau ou la neurogénèse (Schonemann et al., 1998). Parmi ceux-ci, le gène *Pou2* semble participer au développement du rhombencéphale et du mésencéphale chez le poisson-zèbre. *Pou2* est exprimé très tôt au cours du développement puisque des transcrits d'origine maternelle sont présents dans les œufs non fécondés et une expression à la fois zygotique et maternelle est observée jusqu'à la gastrulation. À la fin du processus d'épibolie, l'expression de *Pou2* est restreinte aux mésencéphale et rhombencéphale présomptifs puis plus spécifiquement à r2 et r4 avant de disparaître du cerveau en début de somitogénèse (Takeda et al., 1994; Hauptmann and Gerster, 1995; Hauptmann et al., 2002).

Ce gène est muté dans le mutant *spg* isolé initialement par son phénotype de malformation de la MHB (Schier et al., 1996a). Plusieurs travaux ont montré que ce mutant présente également d'importants défauts de segmentation du rhombencéphale (Burgess et al., 2002; Hauptmann et al., 2002). Les frontières inter-rhombomériques ne sont pas formées tandis que l'expression de nombreux marqueurs génétiques est perturbée : *Krox20* est fortement réduit, en particulier dans r3, *MafB* également tandis que le territoire d'expression de *Hoxb1a* est étendu (figure 31).

Pou2 est l'orthologue chez les mammifères de *Pou5f1*, également connu sous le nom d'*Oct3-4* et plus célèbre pour son rôle dans le maintien de la pluripotence des cellules-souches. En effet, *Pou5f1* fait partie avec *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* du cocktail de FTs

dont la surexpression par transduction virale suffit à faire recouvrir un état pluripotent de type cellules souches embryonnaires à des fibroblastes en culture (Takahashi and Yamanaka, 2006; Meissner et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Contrairement à *Pou2* chez le poisson, le rôle d'*Oct3-4* dans la formation du cerveau murin n'est pas clairement établi et l'expression d'*Oct3-4* ne semble pas restreinte aux régions mésencéphaliques et rhombencéphaliques, bien qu'elle suive globalement la même dynamique que celle de *Pou2* chez le poisson (ARNm maternel et zygotique dans l'embryon précoce puis restriction aux cellules de la masse interne, puis aux cellules de l'épiblaste et finalement aux gamètes) (Schöler et al., 1989; Ovitt and Schöler, 1998; Pesce et al., 1998). Toutefois, la surexpression du facteur murin *Oct3-4* chez le mutant ichthyen *spg*, est capable de restaurer l'expression du gène *Pax2.1* au niveau de la MHB, suggérant un certain degré de conservation fonctionnelle (Reim and Brand, 2002). Confortant cette hypothèse, il a été montré que les homologues de *Pou5f1* chez le poulet et le xénope étaient exprimés dans le cerveau antérieur de façon similaire à *Pou2* – bien que le profil transitoire restreint à r2 et r4 n'ait pas été détecté – et que leur déplétion chez le xénope par injection de morpholinos conduisait à une forte réduction d'expression de *Krox20* dans r3 et de *En2* dans la MHB (Morrison and Brickman, 2006; Laval et al., 2007).

Les expériences de perte de fonction chez le xénope et le poisson-zèbre ou de gain de fonction ubiquitaire chez la souris montrent que *Pou2* module la signalisation FGF, et en particulier *FGF8* (Reim and Brand, 2002; Ramos-Mejía et al., 2005; Morrison and Brickman, 2006) tandis que l'insensibilité des mutants *spg* au gain de fonction FGF suggère que *Pou2* pourrait également agir comme médiateur de la signalisation FGF. L'analyse des séquences cis-régulatrices de *Pou2* et des expériences fonctionnelles ont permis de montrer que celui-ci est régulé par une boucle d'autorégulation et est réprimé par l'AR (Hauptmann and Gerster, 1995; Parvin et al., 2008).

La surexpression de *Pou2* chez le poisson ne conduisant pas à l'extension des territoires d'expression de *Krox20* ou *MafB*, il a été suggéré que *Pou2* jouait un rôle essentiellement permissif, notamment en établissant une compétence pour répondre aux signaux FGF (Reim and Brand, 2002). Une partie des résultats présentés dans ce manuscrit remettent en question cette hypothèse.

III.5.e) Les gènes *Nlz*

Les gènes *Nlz* sont deux facteurs à doigt à zinc identifiés chez le poisson-zèbre et constituant une sous-classe de la famille de protéines NET, apparentée à la famille de FTs SP que nous décrivons plus bas. Ils sont caractérisés par la possession de trois motifs protéiques : une boîte 'Buttonhead', un motif SP et un doigt à zinc unique de type C₂H₂. Contrairement aux facteurs SP dont le domaine de liaison à l'ADN comprend trois doigts à zinc C₂H₂ successifs, il n'est pas évident que les protéines NET soient capables de se lier à l'ADN et il se pourrait que le doigt à zinc soit plutôt impliqué dans des interactions protéine-protéine (Nakamura et al., 2004). En revanche, ces facteurs possèdent une activité transcriptionnelle avérée, essentiellement répressive, reposant sur son association avec le cofacteur répressif Groucho et des histones déacétylases (Runko and Sagerström, 2003a, 2004; Nakamura et al., 2008).

Les gènes *Nlz1* et *Nlz2* sont tous les deux exprimés très tôt dans un large domaine postérieur de la plaque neurale. Au début de la neurulation, ils sont détectés dans le rhombencéphale, caudalement à la frontière r3/r4 pour *Nlz1* (Runko and Sagerström, 2003) et vraisemblablement caudalement à la frontière r4/r5 pour *Nlz2* (Runko and Sagerström, 2004). *Nlz1* progresse ensuite antérieurement jusque dans r2. La surexpression de chacun de ces facteurs conduit à une perturbation de la segmentation dans le rhombencéphale antérieur et à l'inhibition de l'expression de *Hoxa2* dans r2 et r3 et de *Krox20* dans r3 au bénéfice de *Hoxb1* qui envahit ce territoire (figure 32, Runko and Sagerström, 2003; Hoyle et al., 2004; Runko and Sagerström, 2004). À l'inverse, l'inhibition simultanée de la traduction des deux gènes *Nlz* conduit à une perte quasi totale de r4 et de l'expression de *Hoxb1* concurrentement à une extension des territoires d'expression de *Krox20* et de r3 et r5 (Hoyle et al., 2004; Nakamura et al., 2008). Le territoire d'expression de *vHNF1* semble lui aussi étendu antérieurement (Nakamura et al., 2008). L'inhibition d'un seul *Nlz* ne produit aucun phénotype, ce qui suggère un certain degré de redondance fonctionnelle entre les deux facteurs (Hoyle et al., 2004) qui semblent donc agir comme répresseurs des gènes d'identité impaire dans r4, comme *Krox20*. Les mécanismes par lesquels les *Nlz* répriment *Krox20* sont en cours d'étude par Charlotte Labalette dans le laboratoire.

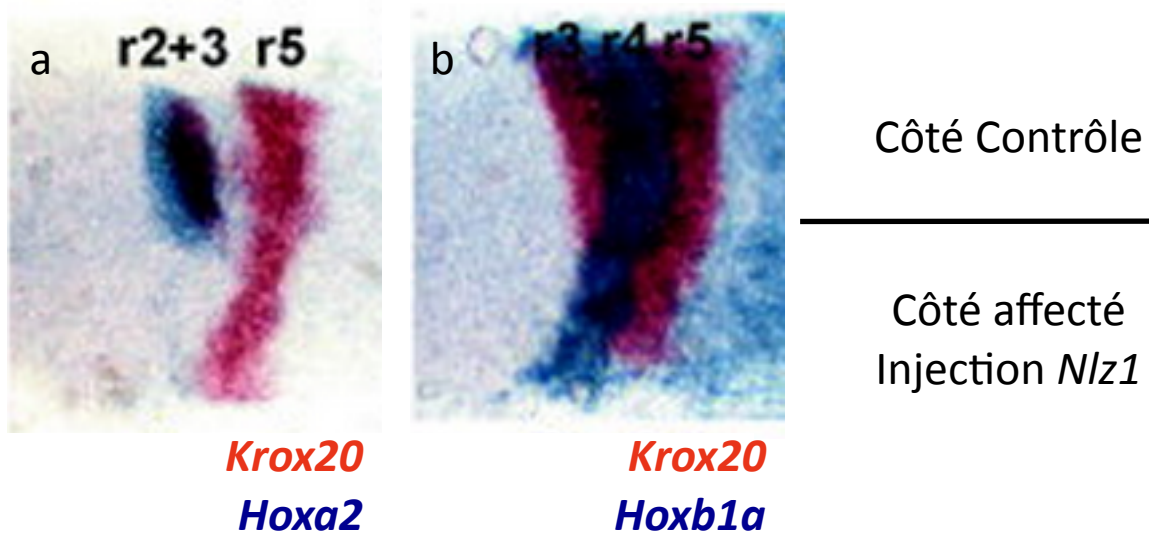


Figure 32. Rôles des *nlz* dans la segmentation du rhombencéphale

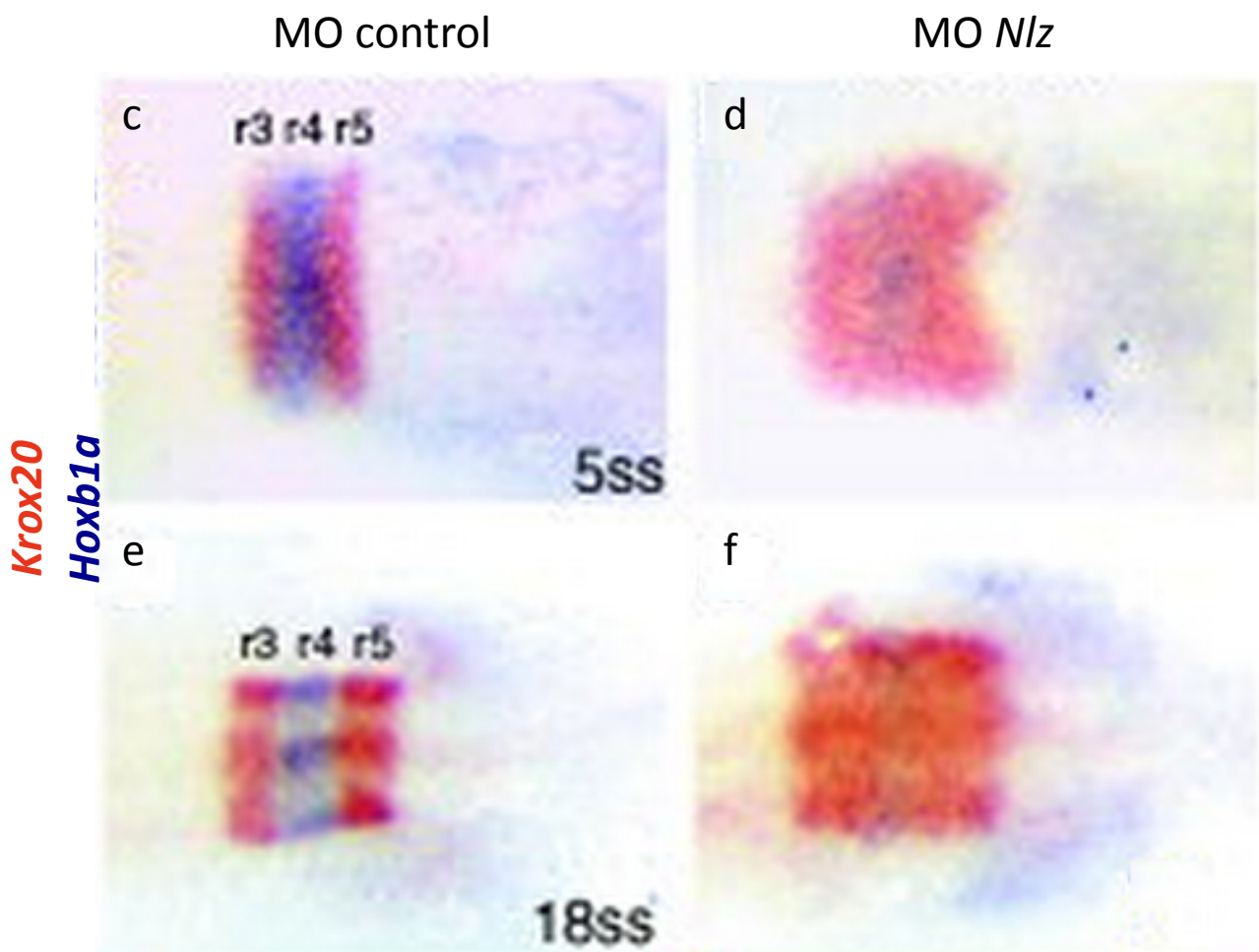
Expériences de gain (a,b) et de perte (c-f) de fonction *Nlz* chez le poisson-zèbre.

a-b: vue dorsale de rhombencéphale d'embryons de 6-10ss injectés au stade 2 cellules dans une seule cellule avec de l'ARN *nlz1* après hybridation in-situ contre *Krox20* (en rouge) et contre *Hoxa2* (bleu, a) ou *Hoxb1a* (bleu, b).

c-f: vue dorsale de rhombencéphale d'embryons de 5 (c, d) et 18 ss (e, f) après injection de morpholinos contrôle (c, e) ou dirigés contre *nlz1* et *nlz2* (d, f). L'expression de *Krox20* (en rouge) et de *Hoxb1a* (en bleu) est visualisée par hybridation in situ.

ss: stade somitique

Extrait de Hoyle et al., 2004.



III.5.f) Le gène *SP5*

Les FTs Sp sont une famille de 9 facteurs à doigts à zinc et dont de nouveaux membres sont régulièrement découverts. Ils sont caractérisés par la possession dans leur partie C-terminale de trois doigts à zinc de type C₂H₂ par lesquels ils interagissent avec des motifs d'ADN riches en GC ou en GT (pour revue : Zhao and Meng, 2005). Comme les facteurs NET, ils possèdent également une boîte 'Buttonhead' qui pourrait être impliquée dans l'activité transactivatrice des Sp (Courey and Tjian, 1988; Athanikar et al., 1997) ainsi qu'un motif Sp dans la partie N-terminale dont la fonction n'est pas déterminée à ce jour. Les facteurs SPs sont principalement connus à travers le premier membre caractérisé Sp1, dont l'expression est ubiquitaire et qui prend part à la régulation de très nombreux gènes, aussi bien ubiquitaires que spécifiques et impliqués dans le développement et la différenciation neuronale (Yan and Ziff, 1997; Suske, 1999; Yoo et al., 2002; Liu et al., 2004). Cependant d'autres Sp présentent des profils d'expression restreints et jouent des rôles variés dans le développement embryonnaire (Zhao and Meng, 2005).

Parmi eux, le facteur Sp5 montre une expression très dynamique et semble intervenir dans la régionalisation AP précoce du futur rhombencéphale et mésencéphale. Chez le poisson-zèbre, l'homologue *sp5l*, également connu sous le nom de *spr2*, est exprimé brièvement à 75% épibolie dans les tissus ectodermaux et mésodermaux postérieurs jusqu'à une limite antérieure correspondant au futur mésencéphale (Zhao et al., 2003). L'orthologue *bts1*, aussi appelé *sp5*, présente une expression assez semblable mais restreinte à l'épiblaste, et se localise plus tardivement au niveau de la MHB dont il participe au développement (Tallafuss et al., 2001). L'expression du facteur murin *Sp5* semble récapituler ces deux profils (Harrison et al., 2000) tandis que chez le xénope la répartition des profils d'expressions entre les deux orthologues est un peu différente puisque le facteur *XSPR1* est exprimé dans le neuroectoderme, dont la MHB, tandis que le facteur *XSPR2* est trouvé essentiellement dans le mésoderme présomptif (Ossipova et al., 2002).

De façon intéressante, *Sp5l* semble impliqué dans la régionalisation postérieure du neuroectoderme en relayant l'activité postériorisante précoce de la signalisation FGF (Zhao et al., 2003; Sun et al., 2006). En effet, le gain de fonction *sp5l* entraîne l'expansion des territoires d'expression *Krox20* et *Hoxb1b* et réprime les marqueurs antérieurs exprimés au niveau de la MHB tandis que la perte de fonction produit l'effet inverse, un

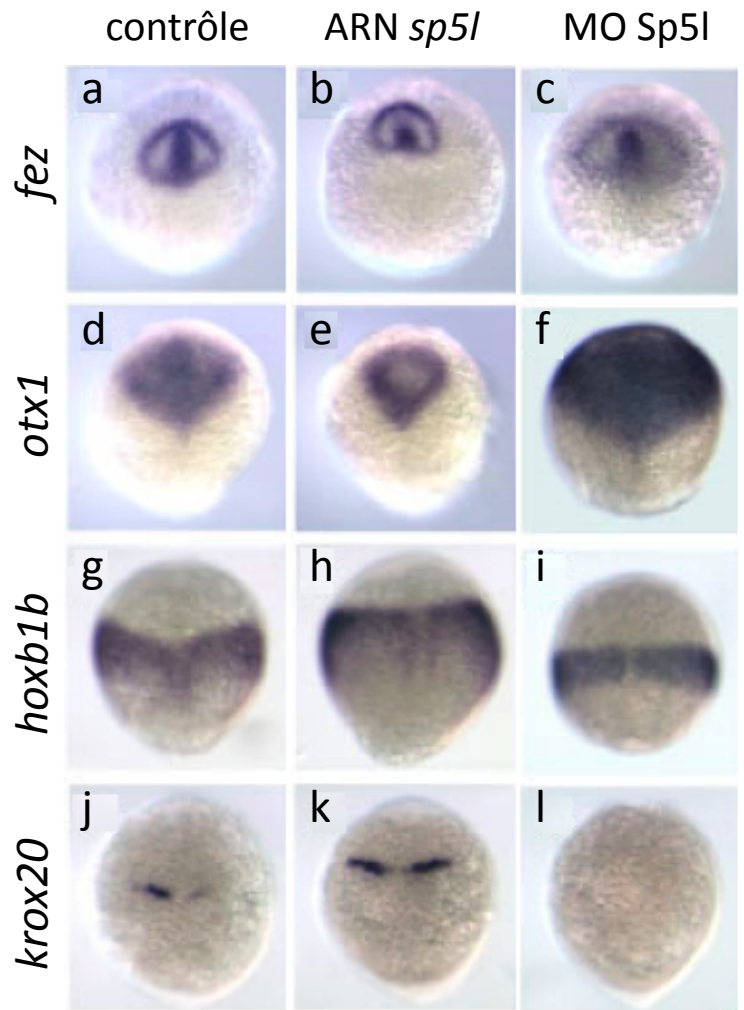
Figure 33. Rôles régulateurs de Sp5l sur les gènes du neuroectoderme

a-l: Profils d'expression visualisés par hybridation in situ de marqueurs du neuroectoderme antérieur: *Fez* (proscéphale – a-c), *otx1* (proscéphale et mésencéphale – d-f) et postérieur: *hoxb1b* (g-i) et *krox20* (r3 – j-l) chez des embryons de poisson-zèbre à 90-100% epibolie en vue dorsale (pôle antérieur vers le haut), sauvages (a,d,g,i) ou injectés avec l'ARN *sp5l* (b,e,h,k) ou des morpholinos inhibant la traduction de Sp5l (c, f, i, l).

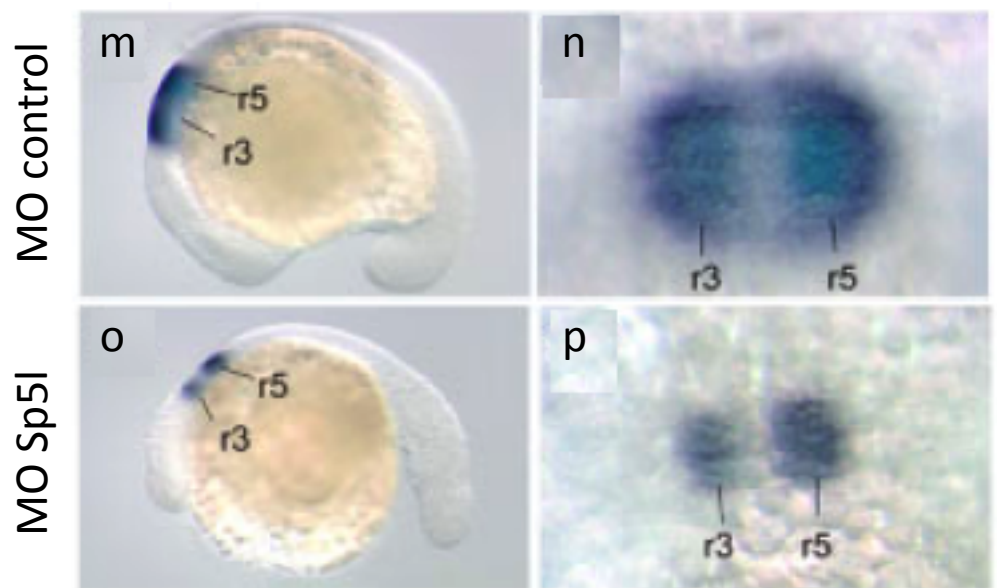
m-p: Vues latérales (m, o) et dorsales centrées sur le rhombencéphale (n, p) d'embryons à 18 ss injectés avec des morpholinos contrôle (m, n) ou contre Sp5l (o, p). L'expression de *krox20* est visualisée par hybridation in situ.

ss : stade somitique.

Extrait de Sun et al., 2006



HIS *krox20*



phénotype similaire au gain ou à la perte de fonction FGF (figure 33). De plus, l'inactivation de la traduction de *sp5l* par injection de morpholinos annule les effets du gain ou de la perte de fonction FGF sur l'expression des marqueurs *Krox20* et *Hoxb1b*. Une autre étude a montré que *sp5l* était également une cible directe de la voie de signalisation Wnt et qu'il agissait de concert avec *bts1* pour transduire l'activité des Wnt dans la régionalisation du mésoderme et du neuroectoderme (Weidinger et al., 2005). Chez la souris, le mutant *Sp5* ne présente pas de phénotype évident. En revanche la combinaison de la mutation *Sp5* sur un fond génétique hétérozygote pour le gène *T*, codant pour le FT Brachyury, produit des souris montrant un nombre réduit de vertèbres, ce qui suggère que des effets de compensation pourraient expliquer l'absence de phénotype chez le mutant *Sp5*. Une partie des travaux présentés dans ce manuscrit suggère que *sp5l* joue un rôle également plus tardivement en montrant que son expression est maintenue dans le rhombencéphale jusqu'au stade 1 ss et que ce facteur régule directement l'expression de *Krox20* dans r3 en agissant comme effecteur de la signalisation FGF dans ce rhombomère.

III.5.g) Le gène *MafB* (*kreisler/valentino*)

MafB code pour un FT de la famille MAF, dont les membres se caractérisent par la présence d'un domaine basique de liaison à l'ADN associé à un domaine de dimérisation de type leucine-zipper (domaine bZIP). *MafB* commence à s'exprimer en tout début de somitogénèse dans les futurs territoires r5 et r6 de la même façon chez les différents groupes de vertébrés et s'y maintient une fois que les rhombomères sont formés (Cordes and Barsh, 1994; Moens et al., 1996; Eichmann et al., 1997; Ishibashi and Yasuda, 2001). Il est le premier gène à présenter une expression restreinte à deux rhombomères.

Chez la souris, la mutation la plus étudiée pour *MafB* se trouve chez le mutant *kreisler* dans lequel une inversion chromosomique, induite par irradiation, sépare le gène d'une partie de ses régions régulatrices et abolit son expression dans r5 et r6 (Cordes and Barsh, 1994). Il en résulte une perte de la segmentation morphologique postérieurement à r4, une disparition de r5 et une spécification altérée de r6 (figure 34, McKay et al., 1994; Manzanares et al., 1999b). Ces deux segments sont remplacés par un domaine anormal de la taille d'un seul rhombomère, dépourvu de tout marqueur spécifique de r5, comme *Krox20*, et de certains marqueurs de r6 comme *Hoxa3* ou de r5

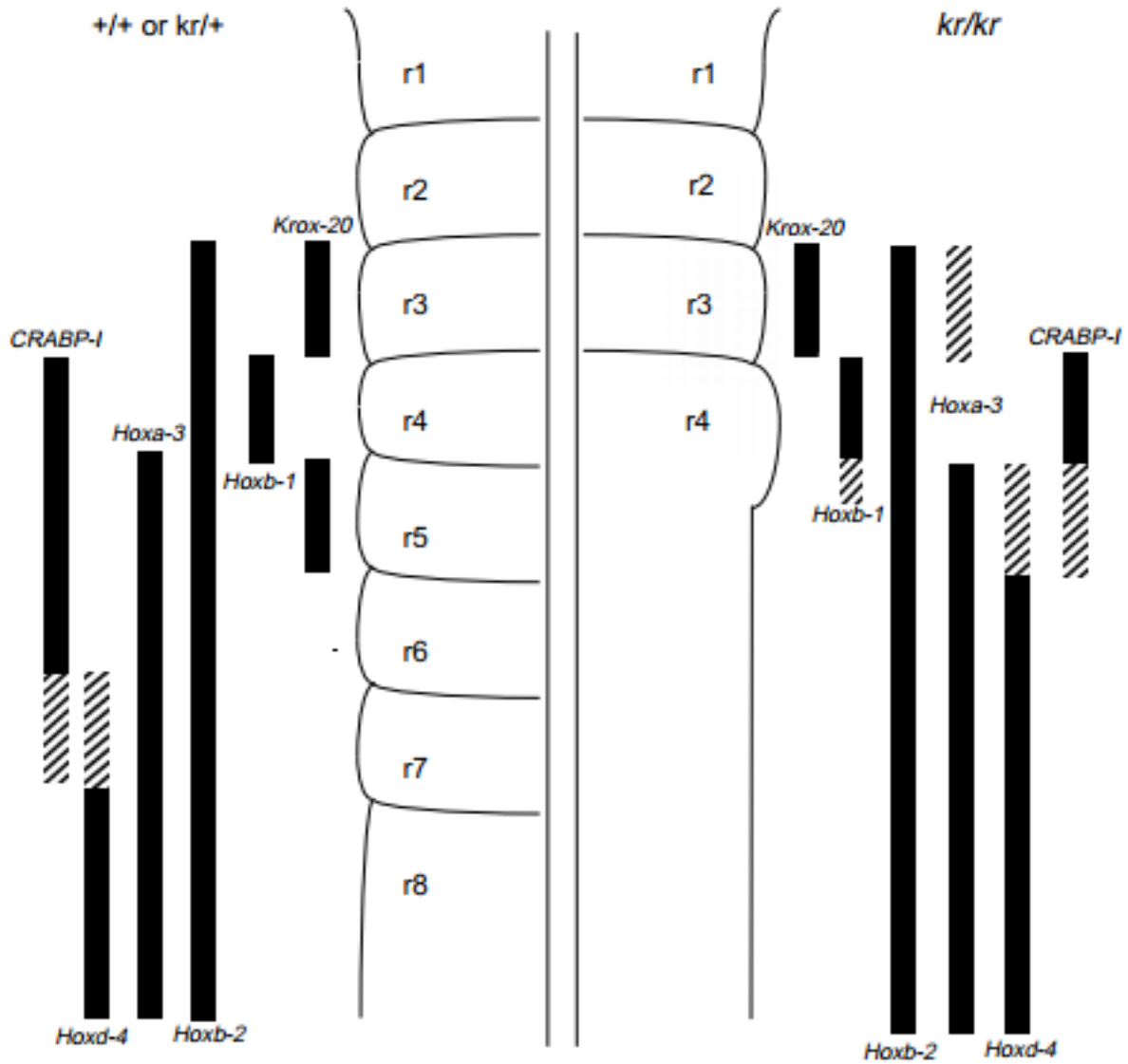


Figure 34. Conséquences morphologiques et génétiques dans le rhombencéphale de l'inactivation de **MafB**

Représentation schématique d'un rhombencéphale de souris sauvage (à gauche) ou homozygote pour la mutation *kreisler* (à droite). Les hachures figurent une expression plus faible ou diffuse. La segmentation morphologique est perdue postérieurement à r4 et l'expression des marqueurs génétiques de r5 et r6 est perturbée (*Krox20*, *Crabp-1*). Les territoires d'expression de *Hoxb1* et de *Hoxd4* sont respectivement étendus caudalement et rostralement. *kr* : *kreisler*
D'après McKay et al., 1994.

et r6 comme *c-Jun* (McKay et al., 1994; Manzanares et al., 1999b; Mechta-Grigoriou et al., 2003). À l'inverse, le marqueur de r4 *Hoxb1* s'étend caudalement dans ce nouveau territoire tandis que le marqueur postérieur *hoxb4* s'y étend rostralement (Frohman et al., 1993). Du fait de son identité mixte, ce territoire a été baptisé rX (Moens et al., 1996). Dans le mutant *kreisler*, *MafB* est également exprimé de façon ectopique dans r3, tout comme les gènes *Fgf3* et *Hoxa3*, ce qui découle vraisemblablement du remaniement des régions régulatrices en amont de *MafB* par l'inversion chromosomique. En effet, l'inactivation de *MafB* par knock-out classique produit un phénotype similaire au mutant *kreisler* dans r5 et r6 tandis que r3 n'est pas touché (Sadl et al., 2003).

L'analyse des séquences régulatrices des gènes *Hox* du groupe 3 dans le rhombencéphale a permis de montrer que *MafB* contrôle l'identité des rhombomères 5 et 6 en activant directement l'expression de *Hoxa3* dans r5-r6 et de *Hoxb3* dans r5 (Manzanares et al., 1997, 1999a). L'expression de *Hoxb3* dans r5 dépend également de *Krox20* qui coopère avec *MafB* sur un élément *cis*-régulateur situé en amont du gène (Manzanares et al., 2002). De plus, des expériences de surexpression chez le poulet montrent que *MafB* inhibe l'expression de *Hoxb1* et est donc vraisemblablement impliqué dans le positionnement de la frontière r4/r5 (Giudicelli et al., 2003).

MafB est également impliqué dans la régulation de *Krox20*. En effet, l'injection d'ARN *MafB* chez le poisson-zèbre est capable de restaurer l'expression de *Krox20* perdue dans r5 chez le mutant *vHnf1* (Wiellette and Sive, 2003). De plus, l'analyse de l'élément régulateur contrôlant l'expression de *Krox20* dans r5 montre que *MafB* se fixe sur deux sites conservés indispensables à l'activité de cet élément et que la surexpression de *MafB* par électroporation chez le poulet l'active de façon ectopique (Labalette et al., 2011). Enfin, l'analyse fonctionnelle des séquences régulatrices de *vHnf1* chez la souris suggère que ce gène peut lui aussi être régulé directement par *MafB* (Pouilhe et al., 2007).

Plusieurs allèles contenant des mutations de l'orthologue du gène *MafB* chez le poisson ont été caractérisés et collectivement baptisés *valentino* (Moens et al., 1996, 1998). Leur phénotype, globalement similaire au mutant *kreisler*, présente toutefois quelques différences légères concernant les défauts de spécification : le segment rX chez le poisson ne présente aucun marqueur spécifique de r5 ni de r6 et ses cellules ne peuvent s'intégrer dans le rhombomère 5 ou 6 d'un embryon sauvage. Il a donc été proposé le modèle selon lequel *MafB* est nécessaire à l'établissement d'un « proto-

rhombomère » et à subdivision ultérieure en r5 et r6 (Moens et al., 1996, 1998; Prince et al., 1998). Chez le mutant murin *kreisler* en revanche, le territoire rX exprime quelques marqueurs de r6 et ses cellules peuvent contribuer à un r6 sauvage. De même, alors que l'expression de *Fgf3* est affaiblie dans le rhombencéphale caudal du mutant *kreisler* (McKay et al., 1996), elle est au contraire étendue dans rX chez le poisson *valentino* (Kwak et al., 2002).

Les deux acteurs majeurs contrôlant l'expression de *MafB* sont *vHnf1* et les FGFs. *vHnf1* est un régulateur clé de *MafB* dont l'expression est totalement abolie dans le mutant *vHnf1* (Sun and Hopkins, 2001; Hernandez et al., 2004; Aragón et al., 2005). L'élément régulateur de *MafB* contient un site de fixation pour la protéine *vHnf1* nécessaire à son expression (Kim et al., 2005a) et, puisque *MafB* pourrait contrôler lui-même *vHnf1*, l'expression de *MafB* est potentiellement dépendante d'une boucle indirecte d'auto-régulation. La capacité qu'a *MafB* à activer sa propre expression par électroporation chez le poulet conforte cette hypothèse (Giudicelli et al., 2003).

Parallèlement, l'inactivation de la signalisation FGF chez le poisson-zèbre par injection de morpholinos dirigés contre *Fgf3* et *Fgf8* aboutit à la perte d'expression de *MafB*, tandis que celle de *vHnf1* n'est pas affectée (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002). De même, l'application de billes FGF au niveau du premier somite chez un poulet entraîne l'activation ectopique de *MafB* postérieurement à r6 (Marín and Charnay, 2000; Aragón et al., 2005). Il semble que ce soit plus particulièrement la voie de signalisation Ras/Erk qui soit impliquée (Aragón and Pujades, 2009). D'autres études confirment que *vHnf1* et la voie de signalisation FGF agissent de façon synergique pour activer l'expression de *MafB* (Wiellette and Sive, 2003; Hernandez et al., 2004) tandis que de récents travaux suggèrent que l'homéofacteur caudal *Cdx1* réprime l'expression de *MafB* postérieurement à r6 (Sturgeon et al., 2011).

III.5.h) Le gène *vHnf1*

Le gène *vHnf1* (*variant Hepatocyte Nuclear Factor 1*), également connu sous le nom de *Hnf1 β* , *Tcf2* ou *LF-B3*, code pour un FT possédant un domaine de fixation à l'ADN de type POU, composé d'un homéodomaine et d'un domaine Pou-spécifique. Il constitue avec le gène *Hnf1* (*Hnf1 α /Tcf1/LF-B1*) la famille HNF1 (Power and Cereghini, 1996). Dans le tube neural, *vHnf1* commence à s'exprimer peu avant le début de la

somitogénèse dans un large domaine de la plaque neurale dont la limite antérieure préfigure puis correspond à la future frontière r4/r5. Postérieurement, l'expression s'étend jusqu'au nœud en diminuant progressivement d'intensité (Barbacci et al., 1999). Ce profil d'expression est très conservé chez les vertébrés (Sun and Hopkins, 2001; Aragón et al., 2005).

De manière similaire au mutant *valentino*, la mutation *vHnf1* chez le poisson-zèbre est associée à une perte de segmentation du rhombencéphale postérieurement à r4. L'expression de *Krox20* dans r5 et de *MafB* dans r5-r6 est perdue tandis que celle de *Hoxb1a* dans r4 s'étend postérieurement (figure 35, Sun and Hopkins, 2001; Wiellette and Sive, 2003). À l'inverse, la surexpression de *vHnf1* chez le poisson-zèbre conduit à ce que r4 acquière une identité de type r5 : *Hoxb1a* n'est plus détecté dans ce territoire tandis que *Krox20* et *MafB* y sont exprimés de façon ectopique. La conjonction avec un gain de fonction FGF, par greffe de bille ou surexpression de *Fgf3*, provoque une nettement plus spectaculaire activation ectopique de *Krox20* et *MafB* (figure 35, Wiellette and Sive, 2003; Hernandez et al., 2004).

Ces données, conjointes à des études réalisés chez le poulet (Aragón et al., 2005), ont conduit à ce que soit proposé le modèle selon lequel *vHnf1* agit en synergie avec le signal FGF en provenance de r4 pour activer les gènes *Krox20* et *MafB* dans r5 et r6 tandis qu'il réprime *Hoxb1*, et donc l'identité r4, indépendamment des FGFs mais via l'induction de *Krox20*, qui va coopérer avec les PIASx β pour assurer cette répression (Garcia-Dominguez et al., 2006). Ce modèle est conforté par des travaux réalisés sur les séquences gouvernant l'expression de *MafB* et de *Krox20* dans r5 et montrant que la protéine *vHnf1* s'y fixe directement via un site conservé essentiel à l'activité de des séquences régulatrices (Kim et al., 2005a; Chomette et al., 2006). L'étude de la mutation *vHnf1* dans le rhombencéphale murin est compliquée par le fait que, suite à un défaut de formation de l'endoderme viscéral, les embryons mutants ne s'implantent pas et meurent à 6 jpc (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Des travaux utilisant un mutant conditionnel semblent néanmoins confirmer le rôle de *vHnf1* dans la répression de *Hoxb1* (Sirbu et al., 2005).

vHnf1 est donc directement impliqué dans la formation des rhombomères 5 et 6 en activant les acteurs moléculaires spécifiques de ces segments. Il est également nécessaire à l'établissement de la frontière r4/r5, en interaction avec le gène ichthyen *ziro7*, homologue du gène murin *irx3* et exprimé de manière complémentaire à *vHnf1*

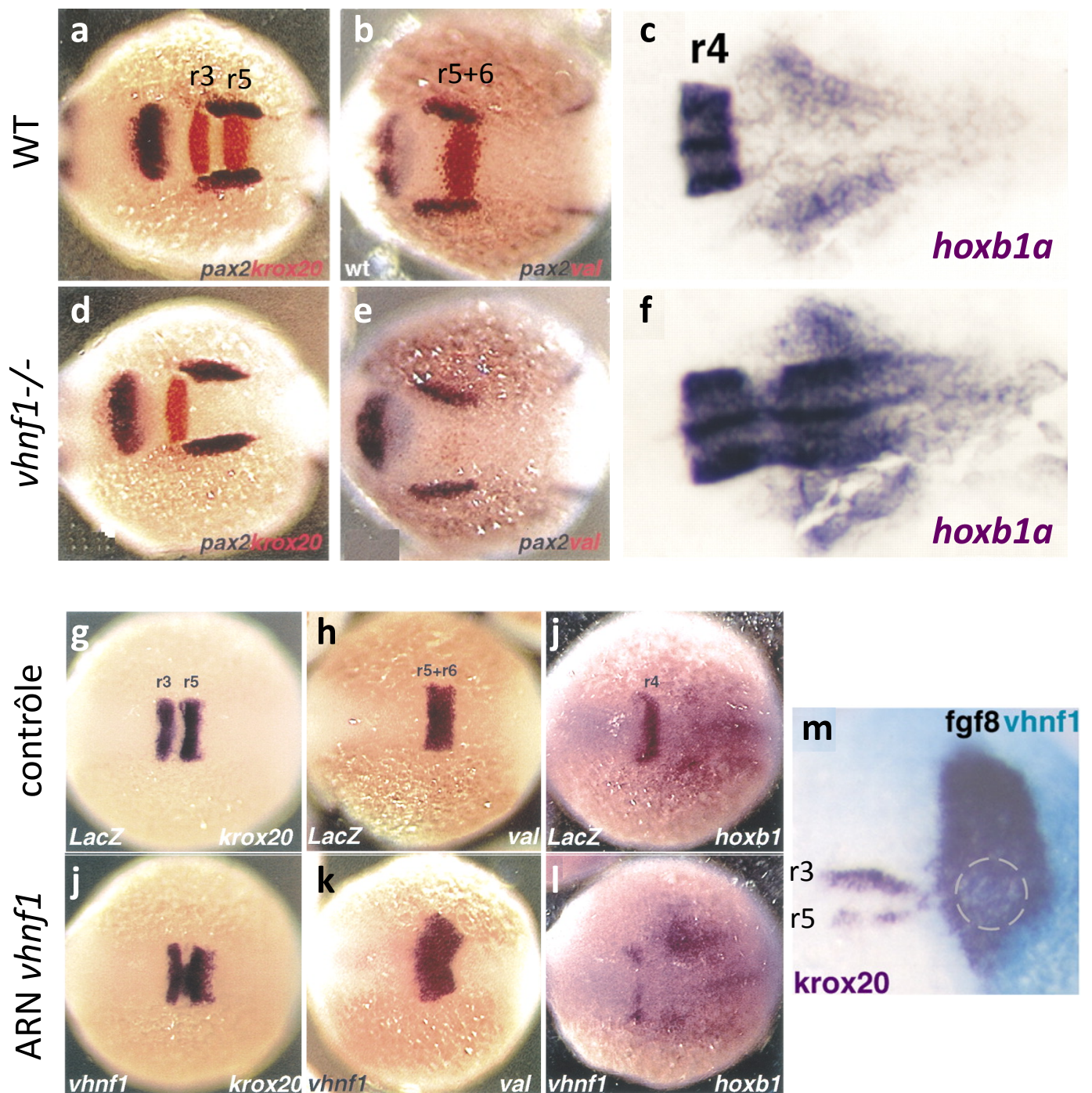


Figure 35. Rôle de *vHnf1* dans la segmentation du rhombencéphale

Expériences de perte (a-f) et de gain (g-m) de fonction chez le poisson-zèbre.

a-f: Profils d'expression de *krox20* (en rouge) et de *pax2* (en bleu) (a,d), de *mafB/val* (en rouge) et de *pax2* (en bleu) (b, e) et de *hoxb1a* (c, f) chez des embryons à 8 ss (a, d), 4 ss (d, e) ou 18 ss (c, f), sauvages (a-c) ou mutants pour le gène *vhnf1* (d- f).

g-l: Profils d'expression de *krox20* (g, j), *mafB/val* (h, k) ou de *hoxb1a* (j, l) chez des embryons à 4 ss injecté avec de l'ARN contrôle *LacZ* (g-j) ou *vhnf1* (j-l).

m: L'injection d'ARN *vHnf1* dans une cellule au stade deux cellules combinée avec la greffe d'une bille FGF8 (cercle discontinu) induit très fortement l'expression ectopique de *krox20* (côté droit de l'embryon).

Le pôle antérieur des embryons est dirigé vers la gauche sauf pour m où il est vers le haut.

ss : stade somitique.

Extraits de Sun et Hopkins, 2001 et de Wiellette et Sive, 2003

dans le rhombencéphale, antérieurement à la frontière r4/r5 (Lecaudey et al., 2001). En se réprimant mutuellement, ces deux facteurs vont contrôler le positionnement de la frontière r4/r5 (Lecaudey et al., 2004).

L'AR semble constituer le principal régulateur de l'expression de *vHnf1*. En effet, de nombreuses expériences de perte ou de gain de fonction ciblant l'AR, réalisées chez la souris ou le poisson-zèbre et utilisant des protocoles variés faisant intervenir des mutants génétiques, des antagonistes chimiques ou des billes, conduisent respectivement à une diminution d'expression de *vHnf1* ou à son expression ectopique (Hernandez et al., 2004, 2007; Maves and Kimmel, 2005; Sirbu et al., 2005). L'identification de l'élément régulateur responsable de l'expression de *vHnf1* dans le rhombencéphale a permis de confirmer l'implication de l'AR dans l'expression de ce gène et de montrer que celle-ci était directe (Pouilhe et al., 2007). Cet élément régulateur contient en effet un site RARE dont la mutation abolit son activité. La même étude a montré qu'il contenait également des sites de reconnaissances pour les protéines Maf, reconnus par MafB *in vitro* et nécessaire à l'activité de l'élément. L'identité des protéines Maf responsables de cette régulation reste cependant à établir. Par ailleurs, il semble qu'un signal FGF, qui n'est ni *Fgf3* ni *Fgf8*, soit nécessaire à l'activation très précoce de *vHnf1* (Roy and Sagerström, 2004) tandis que le maintien de son expression en est indépendant (Aragón et al., 2005). Enfin, des études chez le poisson-zèbre suggèrent une implication des gènes *Hox* du groupe 1 dans la régulation de *vHnf1* (Waskiewicz et al., 2002b; Choe and Sagerström, 2004).

III.5.i) Le gène *Krox20*

Le gène *Krox20* joue un rôle central dans le développement du rhombencéphale et dans la mise en place des segments impairs. Il a été découvert par l'équipe de Patrick Charnay, il y a 24 ans, et identifié chez la souris comme un gène possédant un domaine de liaison à l'ADN homologue à celui du gène de segmentation de type « gap » *Krüppel* (*Kr*) chez la drosophile (Chavrier et al., 1988a), d'où il tire son nom d'usage (*Krox* pour *Kr* box), et comme un facteur impliqué dans la réponse au sérum et dans la transition G0/G1 en culture cellulaire (Chavrier et al., 1988b), propriété qui lui vaut son nom de baptême officiel *Egr2* (*Early Growth Response*).

L'identification de *Krox20* suit de peu celles des homologues des gènes *Hox* de drosophile chez la souris et les découvertes sur ses fonctions moléculaires et génétiques

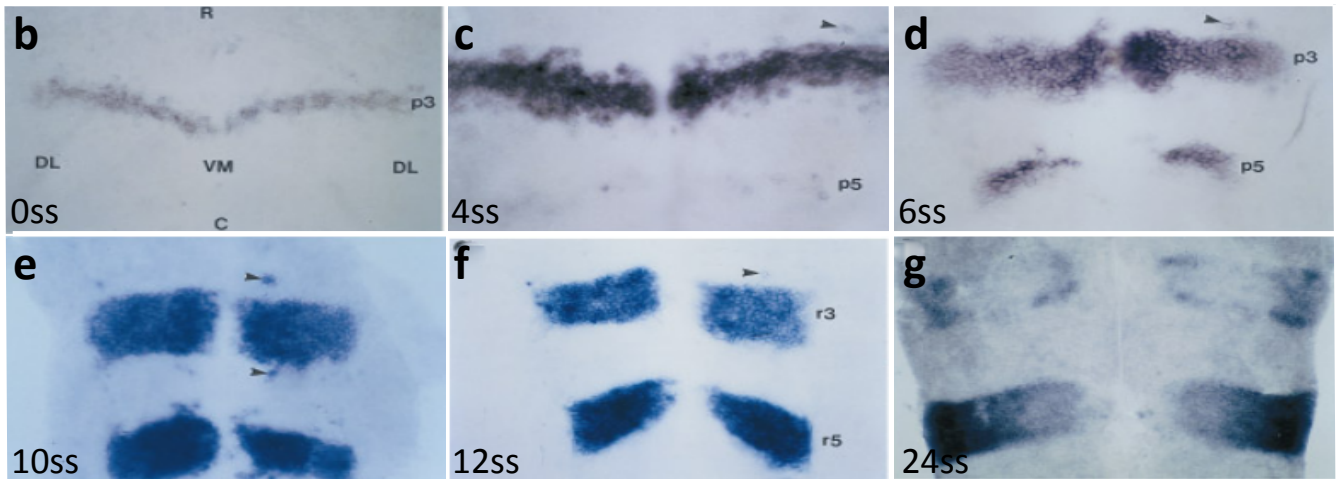
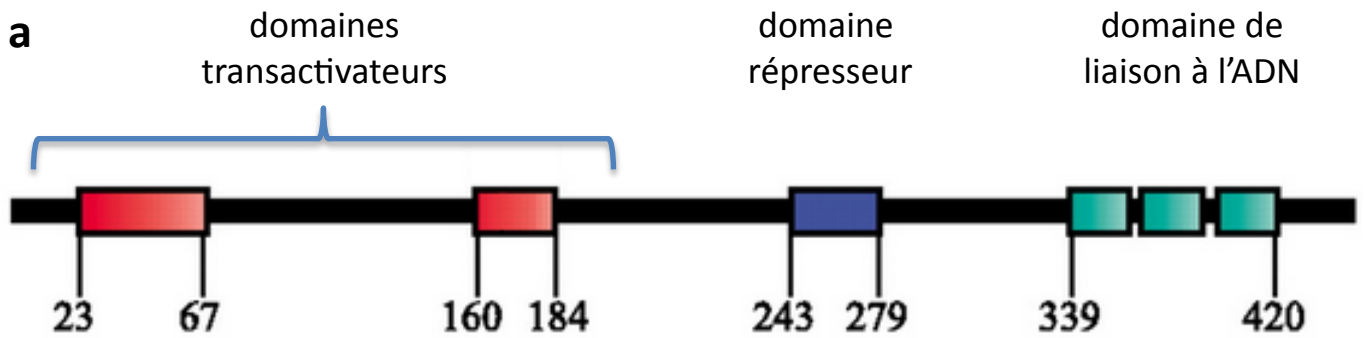


Figure 36. **Structure protéique et profil d'expression de *Krox20***

a: Schéma de la structure de la protéine *Krox20* représentant les principaux domaines caractérisés. Les chiffres représentent la position des acides aminés.

D'après Desmazières et al., 2009.

b-g: Cinétique d'expression de *Krox20* suivie par hybridation in situ sur embryons montés à plat de 0 ss (b), 4 ss (c), 6 ss (d), 10 ss (e), 12 ss (f) et 24 ss (g)

pr : pré-rhombomère, R : rostral, C : Caudal, DL : dorso-latéral, VM : ventro-médial.

Extrait de Wilkinson et al., 1989

ainsi que son implication dans le processus de segmentation du rhombencéphale accompagnent et contribuent au formidable essor qu'a connu la génétique moléculaire du développement à partir de la fin des années 80. Le récit chronologique des différentes étapes conceptuelles et scientifiques ayant mené à la connaissance actuelle des mécanismes de segmentation du rhombencéphale et du rôle de *Krox20* en leur sein se trouve narré, avec un sens aigu de l'histoire et du contexte, dans la thèse de Michel Wassef, précédent doctorant au laboratoire. Le lecteur attiré par une rétrospective historique y trouvera un intérêt certain. Dans ce chapitre, nous nous contenterons de dresser le bilan des différentes fonctions caractérisées pour *Krox20* dans le processus de segmentation du rhombencéphale et des mécanismes connus contrôlant sa régulation.

III.5.i)α : *Krox20* et la segmentation du rhombencéphale

Krox20 est un FT de 470 acides aminés et possédant trois doigts à zinc de type C₂H₂ par lesquels il interagit avec l'ADN en se fixant sur une séquence-cible de 9 pb : 5'-GCG^T/cGGGCG-3' (Chavrier et al., 1990). L'analyse de la structure de la protéine a identifié de plus deux domaines transactivateurs transcriptionnels (figure 36) et un domaine répresseur liant les protéines Nab (Vesque and Charnay, 1992; Russo et al., 1995) tandis qu'une étude plus récente souligne la diversité des modes d'action de *Krox20* sur ses cibles transcriptionnelles (Desmazières et al., 2009).

- Cinétique d'expression (figure 36)

Krox20 est exprimé dans de nombreux tissus pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte, notamment le système nerveux périphérique (Topilko et al., 1994; Ghislain et al., 2002), les ostéoblastes (Levi et al., 1996) ou les tendons (Lejard et al., 2011). Dans le rhombencéphale des vertébrés, son profil d'expression est très conservé et apparaît dans deux bandes qui préfigurent puis coïncident avec les rhombomères 3 et 5 selon une cinétique stéréotypée, ainsi que dans la crête neurale issue de r5 (figure 36, Wilkinson et al., 1989; Nieto et al., 1991; Bradley et al., 1993; Oxtoby and Jowett, 1993; Saldivar et al., 1997) :

- l'ARNm de *Krox20* est d'abord détecté à 7,75 jpc chez la souris dans une fine bande au niveau du futur r3 qui va s'étendre pour atteindre chez la souris une largeur AP d'environ 12 cellules au stade 4 somites (ss);

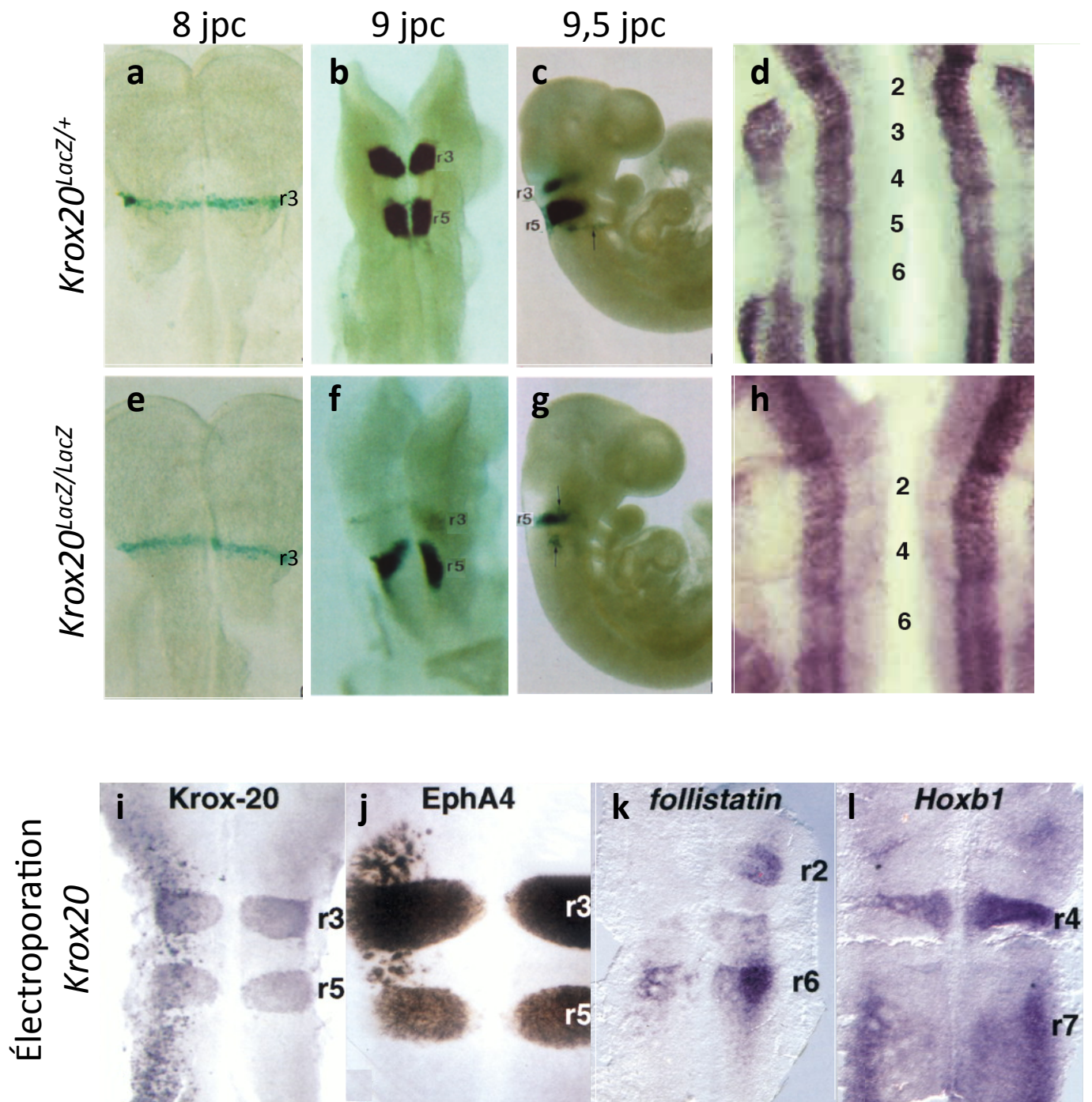


Figure 37. Rôles de *Krox20* dans la segmentation du rhombencéphale

a-h: Le marquage β -gal de mutants *Krox20* au sein desquels le gène *LacZ* a été inséré en lieu et place du locus *Krox20* permet de constater que le démarrage de l'expression de *Krox20* est normal mais que celle-ci n'est pas maintenue (a-c, e-g). Les rhombomères 3 et 5 sont perdus dans le mutant *Krox20*, ce qui est visualisé par un marquage de *lim1* par hybridation in situ (d, h)

Extrait de Schneider-Maunoury et al., 1993 et Schneider-Maunoury et al., 1997.

i-l: La surexpression de *Krox20* par électroporation chez le poulet entraîne l'expression ectopique de marqueurs de rhombomères d'identité impaire, dont *Krox20* lui-même (i, j) et la répression de marqueurs d'identité paire (k, l). Seul le côté gauche des embryons est électroporé.

Extrait de Giudicelli et al., 2001.

- à ce stade, un nombre croissant de cellules isolées situées au niveau du futur r5 vont à leur tour exprimer *Krox20* jusque former une seconde bande qui va s'élargir et atteindre au stade 10 ss une taille comparable à la bande dans r3;
- les frontières d'expression de ces deux territoires, jusqu'ici irrégulières, vont alors s'affiner et les cellules de la crête neurale issue de r5 vont également exprimer *Krox20*.
- puis dès le stade 12 ss, l'expression de *Krox20* va commencer à s'affaiblir dans r3 puis dans r5, d'abord ventralement, pour disparaître complètement à 9,5 jpc pour r3 et 10,5 jpc pour r5.

Pour chaque rhombomère, on peut donc distinguer trois phases d'expression de *Krox20* avec un léger retard de r5 par rapport à r3 : une phase d'extension du territoire, une phase de stabilisation des frontières et une phase d'extinction ventro-dorsale.

- *Krox20* est nécessaire à la formation des rhombomères 3 et 5

Le mutant murin *Krox20*, au sein duquel le gène rapporteur *LacZ* a été inséré en lieu et place du locus *Krox20*, met en évidence le rôle central de ce gène dans la segmentation du rhombencéphale puisqu'il se caractérise par une réduction de la taille du rhombencéphale et par la disparition des rhombomères 3 et 5 (figure 37, Schneider-Maunoury et al., 1993). Les cellules destinées à former le rhombomère 3 sont reprogrammées en cellules de r2 et r4 et celles de r5 en r6 (Voiculescu et al., 2001). Dans un second temps, la taille du rhombencéphale diminue à travers un réajustement de la taille des rhombomères pairs par apoptose, de sorte que les rhombomères pairs subsistant dans le rhombencéphale mutant ont une taille comparable aux rhombomères sauvages. Les dérivés neuronaux issus de r3 et r5 sont totalement perdus (Schneider-Maunoury et al., 1997) et la navigation axonale des motoneurons au sein des rhombomères restants est perturbée. Il en résulte un dérèglement du système respiratoire (Jacquin et al., 1996) vraisemblablement à l'origine de la mortalité 48h après la naissance constatée sur les deux tiers des nouveaux-nés mutants. Le tiers restant, qui présente également une perturbation de la respiration, survit jusqu'à deux ou trois semaines avant de décéder suite probablement à l'affectation sévère du système nerveux périphérique provoquée par l'absence des cellules de Schwann myélinisantes où *Krox20* est normalement exprimé.

L'insertion du rapporteur *LacZ* au locus *Krox20* permet également de suivre comment s'exprime ce gène en l'absence de la protéine qu'il code (Schneider-Maunoury et al., 1993). Le marquage β -gal sur des embryons mutants entre 8 et 8,5 jpc (0 ss) révèle que *Krox20* commence à s'exprimer correctement au sein de la fine bande de cellules caractéristique du démarrage de l'expression de *Krox20* (figure 37). En revanche, des hybridations *in-situ* contre le gène β -gal montre que ce marquage précoce disparaît rapidement, vers 8 ss. Dans r5 également, le début d'expression est normal chez le mutant mais celle-ci disparaît prématurément vers 15-16 ss. Ces résultats montrent que l'expression de *Krox20* suit une première phase de démarrage, indépendante *Krox20*, et une seconde phase de maintien qui nécessite la protéine *Krox20* qui est donc capable de s'autoréguler. De plus, le domaine d'expression de *Krox20* dans r3 chez le mutant, révélé par activité β -gal, est plus fin que la taille finale du rhombomère sauvage. Cela suggère que la phase initiale d'extension du territoire *Krox20* dans r3 requiert également la protéine *Krox20*.

- *Krox20* est suffisant pour induire les identités impaires et réprimer les identités paires (figure 37)

La fonction de *Krox20* a également été étudiée par des expériences de gain de fonction. Celles-ci ont montré que la surexpression de *Krox20* par électroporation chez le poulet est capable de modifier les identités des rhombomères pairs en y induisant l'expression de marqueurs impairs, comme *Epha4*, et en y réprimant l'expression de marqueurs pairs tels que *Hoxb1* ou *follistatin* (Giudicelli et al., 2001; Garcia-Dominguez et al., 2006). De plus, des études sur les séquences régulatrices d'*Epha4*, de *Hoxb2* et de *Hoxa2*, ont mis en évidence la présence de sites *Krox20* dans les régions dédiées spécifiquement au contrôle de l'expression de ces gènes dans r3 et r5. Ces sites sont indispensables à l'activité des enhanceurs et la surexpression ectopique de *Krox20* dans r4 chez la souris est capable d'induire l'activité de ces enhanceurs dans ce territoire (Sham et al., 1993; Nonchev et al., 1996; Theil et al., 1998). D'autres travaux montrent que *Hoxb3* est également sous le contrôle de *Krox20*, en synergie avec MafB et c-Jun (Manzanares et al., 2002; Mechta-Grigoriou et al., 2003). Chez le mutant *Krox20*, l'expression de ces gènes est altérée, voire absente, dans les rhombomères 3 et 5 et la *follistatine* est exprimée ectopiquement dans r3 (Seitanidou et al., 1997).

Enfin, en accord avec les résultats obtenus chez le mutant, la surexpression de *Krox20* chez le poulet est capable d'induire sa propre expression (Giudicelli et al., 2001), confortant l'existence d'une boucle d'autorégulation positive dont nous connaissons maintenant les assises moléculaires, décrites ci-dessous. Une boucle d'autorégulation négative indirecte et faisant intervenir les répresseurs transcriptionnels Nab1 et 2, semble également contrôler l'expression de *Krox20* dans r3 et r5 (Mechta-Grigoriou et al., 2000).

En résumé, l'ensemble des travaux réalisés sur *Krox20* dans le rhombencéphale montre que celui-ci joue un rôle central dans le processus de segmentation en couplant les processus de mise en place des territoires, de ségrégation cellulaire par l'activation des gènes *Eph* et de spécification de l'identité AP par la régulation des gènes *Hox*. Au vu de ce rôle clef, une attention particulière a été portée au cours des dernières années sur l'étude de la régulation de *Krox20*.

III.5.i)β : Régulation transcriptionnelle de *Krox20* dans le rhombencéphale

Nous avons déjà décrit dans les paragraphes précédents l'ensemble des voies de signalisation (AR, FGF, Wnt) et des FTs (Hox PG1, Irx, Nlz, Pou, SP, vHnf1, MafB) dont des travaux suggèrent l'implication dans la régulation, directe ou indirecte, de *Krox20*. L'identification par le laboratoire de trois séquences *cis*-régulatrices gouvernant l'expression de *Krox20* dans le rhombencéphale a été une étape déterminante pour tenter de clarifier ces interactions génétiques (Chomette et al., 2006). Ces séquences régulatrices sont situées à plusieurs centaines de kbs en amont du TSS de *Krox20* et leur identification n'a été rendue possible que par l'utilisation de chromosome artificiel bactérien de poulet, dont le génome est trois fois plus compact que celui de la souris. La capacité des régions situées en amont et en aval du locus *Krox20* à induire l'expression d'un gène rapporteur a été testée systématiquement, par transgénèse chez la souris ou/et électroporation chez le poulet, jusqu'à isoler trois régions régulatrices minimales et particulièrement conservées (figure 38).

- Élément A

L'élément A, d'environ 500 pb, est situé chez la souris 235 kb en amont du promoteur de *Krox20*. Il est actif dans r3 et r5 dans des embryons sauvages mais pas

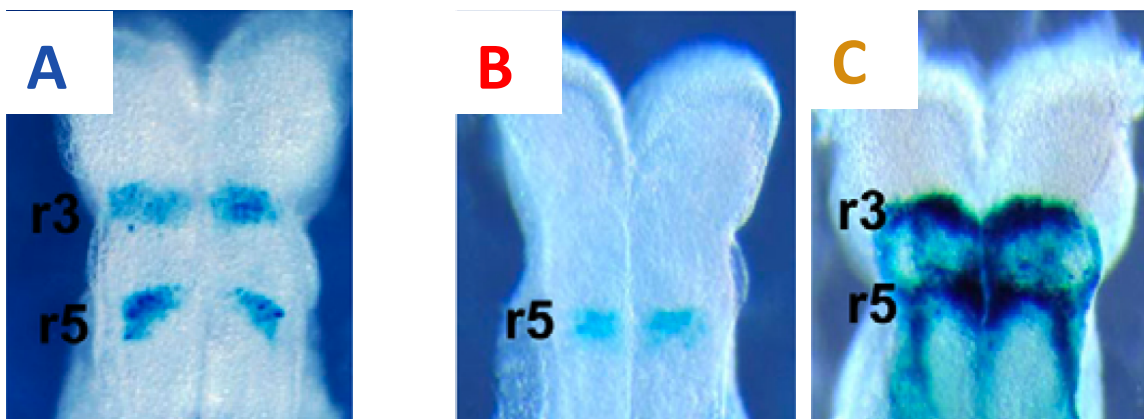
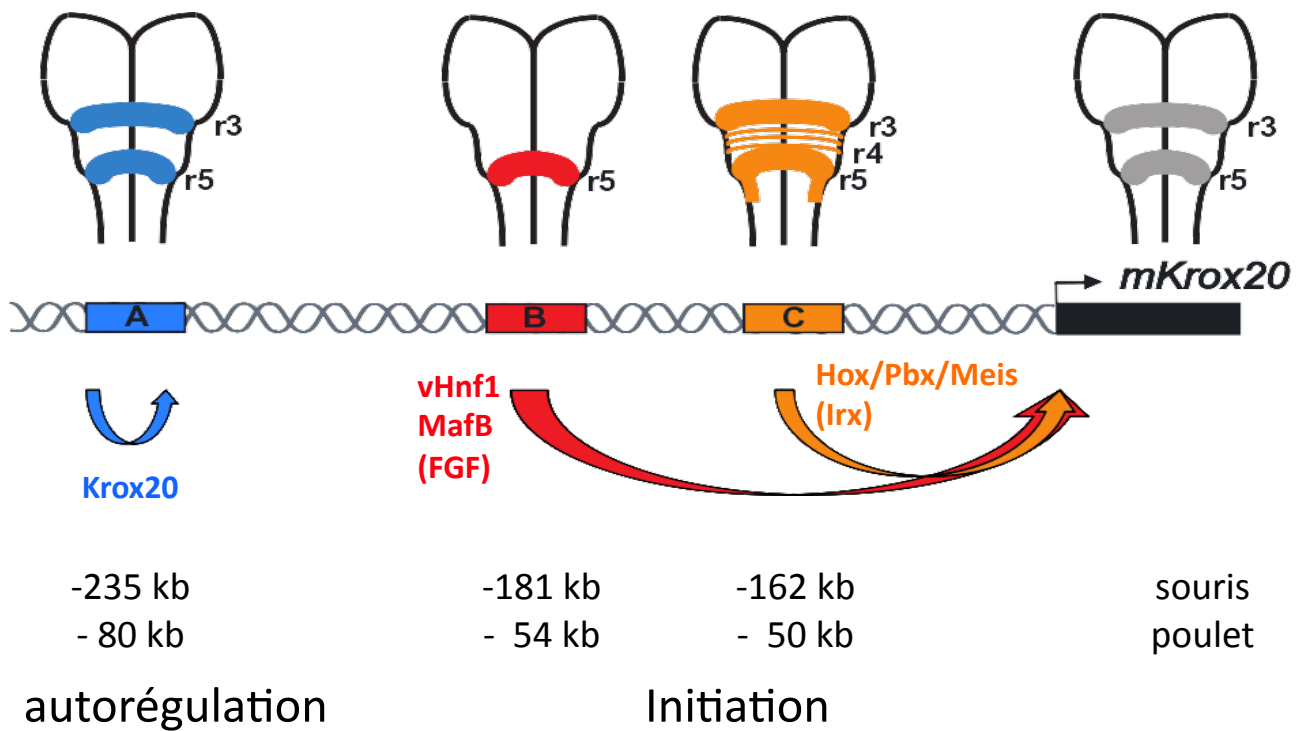


Figure 38. Contrôle transcriptionnel de *Krox20* dans le rhombencéphale

Représentation schématique des éléments *cis*-régulateurs de *Krox20* dans le rhombencéphale, de leurs profils d'activité et de leur distance par rapport au promoteur de *Krox20* chez la souris et le poulet. En bas se trouvent les profils d'activité, visualisés par révélation β -gal, des trois éléments régulateurs clonés en amont du gène *LacZ* chez des souris transgéniques à 8,5 jpc.

Adapté de Chomette et al., 2006.

chez les mutants *Krox20*. De plus, la co-électroporation chez le poulet de *Krox20* avec cet élément cloné en amont d'un rapporteur induit l'expression ectopique de celui-ci dans tout le rhombencéphale (Chomette et al., 2006). L'élément A possède six sites de liaison à la protéine *Krox20* dont la mutation abolit l'activité. L'élément A est donc le siège de la boucle d'autorégulation directe de *Krox20*.

- Élément B

L'élément B se trouve 181 kb en amont de *Krox20* et s'étend sur 500bp. Il est actif uniquement dans r5 et commence à l'être avant que *Krox20* n'apparaisse dans ce rhombomère. L'activité de l'élément B est maintenue dans le mutant *Krox20*. Pour ces raisons, il est considéré comme participant au démarrage de l'expression de *Krox20* dans r5. Le laboratoire a montré que l'élément B contient un site de fixation à *vHnf1* et plusieurs à la protéine *MafB* qui sont nécessaires à son activité et par lesquels *vHnf1* et *MafB* synergisent pour activer l'élément B (Chomette et al., 2006; Labalette et al., 2011). *vHnf1* étant régulé par l'AR, il est vraisemblable que la dépendance de *Krox20* à cette molécule dans r5 se fasse par l'intermédiaire de *vHnf1* (Dupé and Lumsden, 2001). De même, l'inhibition de la signalisation FGF par surexpression du modulateur négatif *Sprouty 4* entraîne l'abolition de l'activité de l'élément B (Labalette et al., 2011), probablement suite de la diminution d'expression de *MafB* qui dépend de la signalisation FGF (Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002). Ainsi, la fixation de *MafB* sur l'élément B constitue vraisemblablement le mécanisme par lequel la signalisation FGF contrôle l'expression de *Krox20* dans r5.

- Élément C

L'élément C est le principal sujet d'étude de ce manuscrit. Il est situé 162 kb en amont du promoteur de *Krox20* chez la souris et se distribue sur environ 1 kb. Son clonage en amont du gène *LacZ* au sein de souris transgéniques permet de suivre son activité par révélation β -galactosidase (figure 39). L'activité β -galactosidase induite par l'élément C commence à être détectable à 2 ss dans r3 et à 5-6 ss dans r5 dans des territoires initialement réduits et qui vont s'étendre, selon une dynamique reflétant celle de l'expression de *Krox20*. À 8 ss, l'élément C induit une expression forte dans r3 et r5 et dans la crête neurale dérivée de r5 ainsi qu'une expression plus faible et hétérogène dans r4. À 13 ss, cette expression induite dans r4 devient homogène et le profil d'activité

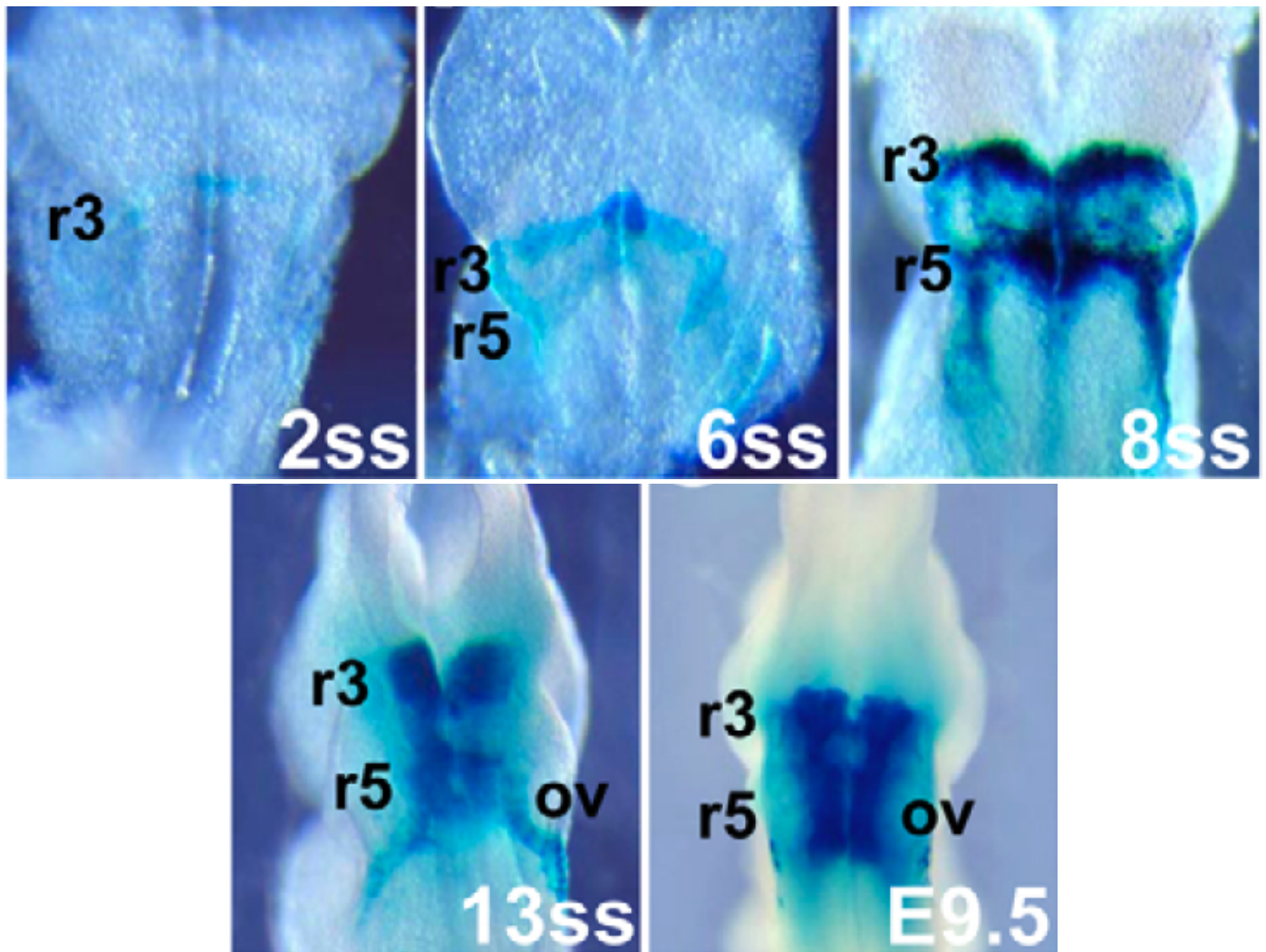


Figure 39. Cinétique d'activité de l'élément C

Souris transgéniques portant l'élément C de poulet cloné en amont du gène *LacZ* après révélation β-gal.
 ov : vésicule otique, r : rhombomère.
 Extrait de Chomette et al., 2006.

de l'élément C apparaît continu de r3 à r5 à 9,5 jpc. L'activité β -galactosidase persiste dans r5 jusque 11,5 jpc.

L'activité de l'élément C est maintenue dans le mutant *Krox20*. L'élément C est donc lui aussi un élément initiateur de l'expression de *Krox20*, contrôlant le démarrage de celle-ci dans r3 et participant peut-être également au démarrage dans r5 avec l'élément B.

Le laboratoire a montré que les facteurs Hox PG1, Pbx1 et Meis2 coopéraient de façon synergique pour activer de façon directe l'élément C dans r3 à travers la fixation sur des sites conservés Meis et bipartites Hox/Pbx (Wassef et al., 2008). Il est proposé que le chevauchement momentané entre les territoires d'expression de *Hoxa1/Hoxb1* et un facteur non identifié à ce jour est à l'origine du démarrage de l'activité de l'élément C dans une fine bande de cellules. En effet, des expériences de traçage cellulaire montrent que parmi les cellules les plus postérieures du territoire r3 certaines ont exprimé *Hoxb1* et/ou *Hoxa1* (Wassef et al., 2008; Makki and Capecchi, 2010).

L'élément C peut aussi être activé chez le poisson-zèbre par la surexpression combinée de Meis1.1 et du facteur *Irx7*, normalement exprimé dans le rhombencéphale antérieur jusque r4 et dont nous avons vu plus tôt le rôle potentiel dans la régionalisation de cette zone (Stedman et al., 2009). Cette étude montre, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, que le facteur *Irx7* est localisé à proximité de l'élément C et du promoteur de *Krox20*, ce qui suggère que ces deux régions génomiques interagissent physiquement probablement au moyen de la formation d'une boucle chromosomique. La fixation d'*Irx7* sur l'élément C est toutefois vraisemblablement indirecte vu qu'aucun site de fixation aux facteurs iroquois n'est trouvé sur l'élément C et qu'aucune fixation *in vitro* par EMSA ('Electrophoretic Mobility Shift Assay') n'a pu être établie.

Enfin, le laboratoire a également montré que l'élément C était sensible à la signalisation FGF (Labalette et al., 2011) et pourrait relayer le contrôle de celle-ci sur l'expression de *Krox20* dans r3 et/ou dans r5. La recherche et l'analyse des facteurs susceptibles d'intervenir dans ce processus font partie des travaux présentés dans ce manuscrit.

L'activité de l'élément C dans r4 est surprenante pour un élément régulateur contrôlant l'expression d'un gène dont l'expression n'est jamais détectée dans ce

rhombomère et fait l'objet d'un paragraphe dans la discussion de ce manuscrit, les travaux réalisés n'ayant pas permis de s'en absoudre.

L'élément C est donc le seul élément initiateur caractérisé dans r3 et constitue à ce titre une clé d'investigation pour comprendre comment l'expression de *Krox20* est activée dans ce rhombomère et restreinte à celui-ci. Les travaux démontrant que cet élément est sous le contrôle direct des Hox PG1, Pbx et Meis ont constitué une première étape importante dans la description des mécanismes sous-tendant cette régulation. Cependant, les domaines d'expression de ces différents facteurs s'étendent postérieurement à r3, jusque dans la moelle épinière, et ne permettent pas d'expliquer le profil restreint d'activité de l'élément C. Même le facteur antérieur *Irx7*, dont la fixation est vraisemblablement indirecte, est exprimé jusque r4. L'intervention d'acteurs transcriptionnels supplémentaires est donc nécessaire pour décrire la régulation de *Krox20* via l'élément C. De même, les facteurs relayant la sensibilité de l'élément C aux FGFs ne sont pas identifiés.

Afin de poursuivre l'étude de cet élément régulateur, j'ai tiré profit du séquençage de nouvelles espèces de vertébrés pour redéfinir ses frontières et y intégrer des séquences conservées voisines ne se trouvant pas dans la version que nous utilisons jusque là. Cette redéfinition modifie partiellement le profil d'activité de l'élément C et j'ai donc cherché à identifier quelle partie des séquences ajoutées lui conféraient ces nouvelles propriétés. J'ai également mis en évidence plusieurs blocs de séquences conservées et nécessaires à l'activité de l'élément C dans r3. De plus, l'élément C redéfini constitue un outil d'étude nettement plus fiable, rendant possible des analyses plus subtiles. Il a ainsi été possible de démontrer que l'élément C était sensible à la signalisation FGF (Labalette et al., 2011).

Parallèlement, afin de circonscrire la recherche de nouveaux facteurs régulant l'élément C aux seuls gènes exprimés dans le rhombencéphale, j'ai réalisé le séquençage exhaustif et différentiel du transcriptome du rhombencéphale murin à 8 jpc par RNA-seq. L'analyse de celui-ci a permis de souligner la fiabilité et la précision de cette méthode novatrice ainsi que de mettre en évidence des FTs dont l'expression spécifique dans le rhombencéphale suggère un rôle dans la segmentation, inconnu jusqu'ici. J'ai effectué de premières études fonctionnelles sur ceux-ci.

De plus, la redéfinition de l'élément C et le RNA-Seq m'ont permis de poursuivre des travaux engagés par Michel Wassef montrant que le facteur SP5 participait à la régulation de cet élément. Ces résultats sont venus s'intégrer dans un projet mené par Charlotte Labalette et Yassine Bouchoucha dans le laboratoire, qui ont étudié la chaîne d'évènements moléculaires par laquelle les signaux FGFs contrôlent la taille et le positionnement de r3 en modulant l'activité de l'élément C. SP5 semble constituer le dernier maillon de cette chaîne.

Enfin, l'analyse du mutant murin au sein duquel l'élément C a été excisé m'a permis d'affiner l'étude fonctionnelle de cet élément et de lui découvrir des propriétés tout à fait inattendues de coopération en *cis* avec l'élément autorégulateur A.

IV. RNA-Seq et autres analyses génétiques à grande échelle du rhombencéphale

Une partie importante du projet présenté dans ce manuscrit s'appuyant sur la réalisation d'une analyse transcriptomique exhaustive et différentielle du rhombencéphale, une brève description des étapes de la technologie RNA-Seq employée sera présentée ici. Les avantages de cette technique ainsi que les différentes possibilités qu'offre son exploitation seront détaillés, en comparaison avec les puces à ADN. Une énumération succincte – non exhaustive – des analyses génétiques à grande échelle déjà entreprises sur le rhombencéphale est également proposée.

IV.1. Les analyses génétiques à grande échelle du rhombencéphale réalisées à ce jour

La segmentation du rhombencéphale est un système hautement complexe faisant intervenir plusieurs réseaux génétiques finement régulés et interagissant entre eux. Afin d'identifier les acteurs de ces différents réseaux et d'évaluer leur contribution fonctionnelle, diverses méthodes ont été utilisées au cours du temps, au fur et à mesure des avancées technologiques.

L'une des premières techniques employées a été le criblage par mutagenèse qui consiste à provoquer, de façon aléatoire par traitement chimique, radioactif ou par insertion virale, des mutations dans le génome des organismes et de sélectionner ensuite les animaux dont le phénotype suggère une perturbation dans le mécanisme de segmentation du rhombencéphale. On localise ensuite l'emplacement de cette mutation dans le génome, par association de celle-ci avec des marqueurs génétiques ou aujourd'hui par séquençage du génome entier. Cela permet déterminer quel gène est atteint et d'identifier ainsi un acteur, éventuellement nouveau, de la segmentation du rhombencéphale dont un premier aperçu de la fonction est donné par le phénotype de

l'animal mutant. C'est de cette façon qu'ont été identifiés les premiers allèles *valentino* chez le poisson-zèbre (Moens et al., 1996). Les cribles par mutagenèse à très grande échelle ont été réalisés essentiellement chez le poisson-zèbre, où la facilité à obtenir un nombre important d'embryons permet des analyses systématiques ciblées, en se focalisant par exemple sur les défauts de développement crânio-facial (Neuhauss et al., 1996), sur la neurogénèse et la morphologie du cerveau (Jiang et al., 1996; Schier et al., 1996b) ou sur la survie neuronale (Abdelilah et al., 1996). Quelques cribles aboutissant à l'identification de gènes intervenant dans le développement du rhombencéphale ont également été publiés chez la souris, où les auteurs sélectionnent des mutants présentant des défauts de comportement (Alavizadeh et al., 2001) ou de développement des nerfs crâniens (Mar et al., 2005). La lourdeur du protocole, en particulier en termes d'analyse de phénotype, ainsi que les variations de sensibilité aux mutations des différentes parties du génome ont conduit à rechercher d'autres approches pour identifier de nouveaux acteurs de la segmentation du rhombencéphale.

Un nombre important de celles-ci, incluant d'ailleurs le RNA-Seq, repose sur le suivi de l'expression des gènes, ce sont donc des cribles par profil d'expression. En effet, des gènes exprimés spécifiquement, ou de façon régionalisée, dans le rhombencéphale au moment de la segmentation sont susceptibles de jouer un rôle dans le processus. Les premières méthodes cherchaient essentiellement à réduire le nombre de gènes à cribler. Une façon simple de faire cela est de choisir de n'étudier qu'une portion des gènes répertoriés. Une étude chez le xénope a par exemple suivi le profil d'expression par hybridation *in situ* à différents stades de développement embryonnaire de 1765 ADNc (ADN complémentaire obtenu par rétro-transcription d'ARNm mûre) choisis aléatoirement (Gawantka et al., 1998). D'autres études se sont focalisées sur les gènes partageant des propriétés physiques, chimiques ou fonctionnelles. Les gènes de ségrégation cellulaire *EphA4*, *EphA2*, *EphB2* et *EphB3* ont par exemple été identifiés au laboratoire en suivant l'expression dans le rhombencéphale de tous les gènes décrits comme possédant une activité tyrosine kinase (Gilardi-Hebenstreit et al., 1992; Nieto et al., 1992; Becker et al., 1994, 1995).

Un autre moyen astucieux de réduire le nombre de gènes à cribler est d'une part de n'étudier que ceux exprimés dans le rhombencéphale, en réalisant une bibliothèque d'ADNc à partir des ARNs extraits de ce tissu, et d'autre part d'en exclure les ADNc des gènes exprimés dans un autre tissu de référence. On parle de bibliothèque d'ADNc

« soustraite » et la soustraction repose sur l'hybridation des ADNc de la bibliothèque du rhombencéphale avec les ADNc – préalablement étiquetés chimiquement – de la bibliothèque de référence. L'étiquette chimique sera ensuite utilisée pour isoler les ADNc double-brin et ne conserver que les ADNc spécifiquement exprimés dans le rhombencéphale. On peut alors ensuite suivre le profil d'expression par hybridation *in situ* des gènes de la bibliothèque d'ADNc soustraite. Cette technique a été utilisée en 2001 par l'équipe du Pr Wilkinson qui a étudié chez le poulet à HH10 le profil d'expression dans le rhombencéphale, le mésencéphale et la moelle épinière de 445 ADNc sélectionnés aléatoirement au sein d'une librairie de rhombencéphale soustraite par une librairie d'embryons à un stade précédant l'invagination de la plaque neurale (Christiansen et al., 2001). En 2003, un criblage par profil d'expression chez le poisson-zèbre vise à l'identification de gènes impliqués dans l'induction du système nerveux postérieur en utilisant une librairie de tissus postérieurs soustraite de tissus antérieurs d'embryons en cours de gastrulation (Yoda et al., 2003).

Le piégeage d'enhancers (enhancer trapping) est une autre approche permettant d'identifier des acteurs potentiels de la segmentation du rhombencéphale sur la base de leur profil d'expression. Elle consiste en l'insertion rétrovirale aléatoire d'un gène rapporteur cloné en aval d'un promoteur minimal (Bayer and Campos-Ortega, 1992; Korn et al., 1992; Balciunas et al., 2004; Parinov et al., 2004). Le gène rapporteur est susceptible de capturer l'activité de séquences régulatrices contrôlant l'expression du gène au voisinage duquel il a été inséré. En sélectionnant les animaux au sein desquels l'expression du gène rapporteur est détectée dans les zones d'intérêt, il est possible de d'identifier le gène correspondant à cette expression en localisant le site génomique de l'insertion, ce qui est facilité par le fait que la séquence nucléotidique de la cassette 'promoteur-gène rapporteur' insérée est connue. L'insertion de la cassette peut parfois perturber l'expression du gène endogène, particulièrement quand elle a lieu dans le locus, ce qui permet alors de disposer d'animaux mutants pour le gène d'intérêt. En 2005, l'équipe du professeur Becker a réalisé un crible par piégeage d'enhancers chez le poisson-zèbre et a identifié le gène *Sprouty 1* comme étant exprimé à différentes étapes du développement et étant une cible des FGFs (Ellingsen et al., 2005; Komisarczuk et al., 2008).

Afin de s'affranchir de l'étape fastidieuse qu'est l'établissement du profil d'expression d'un très grand nombre de gènes, d'autres techniques ont été mises au

point comme le criblage par étalage différentiel d'ARN ("RNA differential display", Liang and Pardee, 1992). Celui-ci consiste à extraire l'ARN d'au moins deux tissus, d'en rétro-transcrire les ARN messagers et de faire migrer les ADNc obtenus par électrophorèse. La comparaison des profils de migration permet de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés entre les tissus comparés. Ces ADNc présents dans une seule condition sont extraits du gel et réamplifiés pour être séquencés, afin d'identifier le gène correspondant, et/ou utilisés directement comme sondes pour hybridation *in situ*. En 2000, l'équipe du Pr Mason s'est servie de cette technique chez le poulet pour mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés dans le prosencéphale, le mésencéphale, r1 et le rhombencéphale et a identifié le gène *Sprouty2* comme une cible des FGFs (Chambers et al., 2000; Chambers and Mason, 2006). Une autre façon de s'affranchir de l'établissement des profils d'expression est l'utilisation de puces à ADN.

Le nombre important d'études liées au développement du rhombencéphale et utilisant des puces à ADN reflète le très grand succès qu'ont rencontré celles-ci pour les analyses génomiques à grande échelle dans un très grand nombre de systèmes. Les puces à ADN permettent de suivre le niveau d'expression des gènes suivant le protocole expérimental général suivant (figure 40) : extraction d'ARN, rétro-transcription en ADNc, étiquetage des ADNc avec un marqueur fluorescent, hybridation sur puce. La puce contient un très grand nombre de sondes choisies en fonction de l'étude. Pour les analyses d'expression différentielle, un panel de sondes couvrant l'ensemble des cadres ouverts de lecture du génome sera généralement utilisé bien qu'il existe également des puces couvrant l'intégralité du génome humain ou murin (*tilling array*). Pour chaque sonde (en réalité groupe de sondes), l'intensité lumineuse sera mesurée et correspondra à la quantité d'ADNc s'étant hybridée, reflétant ainsi le niveau d'expression du gène correspondant. Le plus souvent, ce n'est pas le niveau absolu d'intensité qui est mesurée mais la différence entre deux conditions, chacune étiquetée d'une couleur différente et hybridée sur la même puce.

La grande majorité des expériences utilisant des puces à ADN pour l'étude du développement du rhombencéphale ou des régions voisines ont cherché à identifier les cibles d'un gène donné en comparant le transcriptome d'un embryon sauvage avec celui où ce gène est inactivé, éventuellement après dissection ou tri cellulaire par FACS (« Fluorescence-Activated Cell Sorting »). Des travaux dans ce sens ont été réalisés par exemple pour identifier les cibles de Pax6 chez le rat (Numayama-Tsuruta et al., 2010),

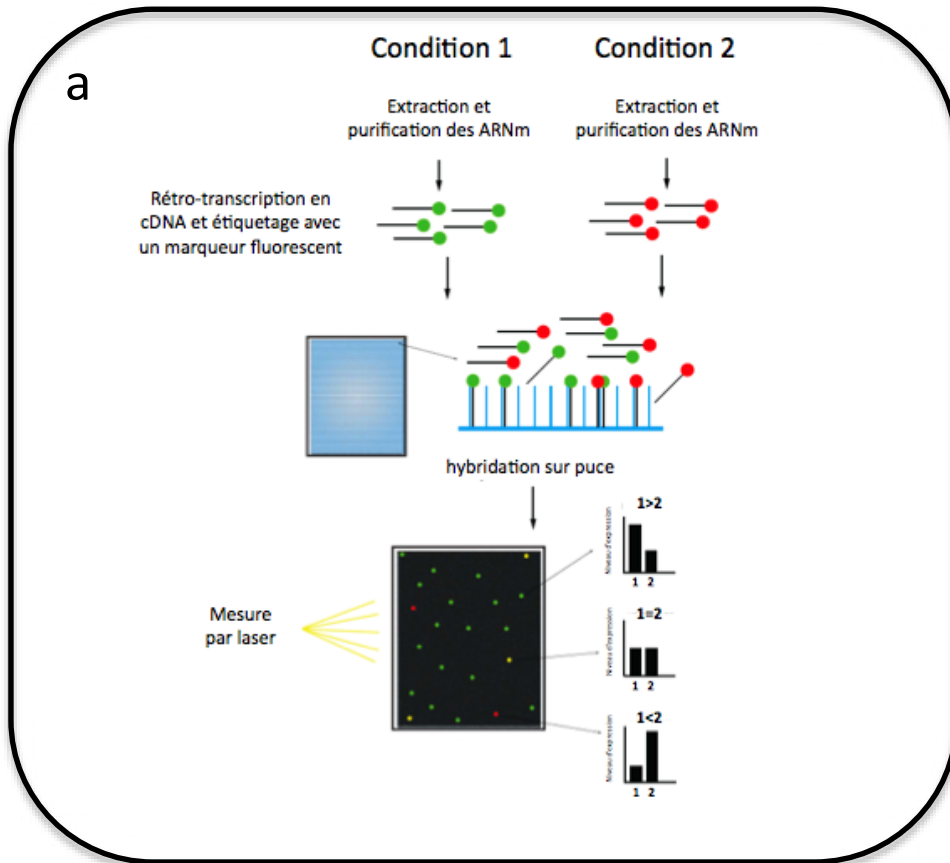
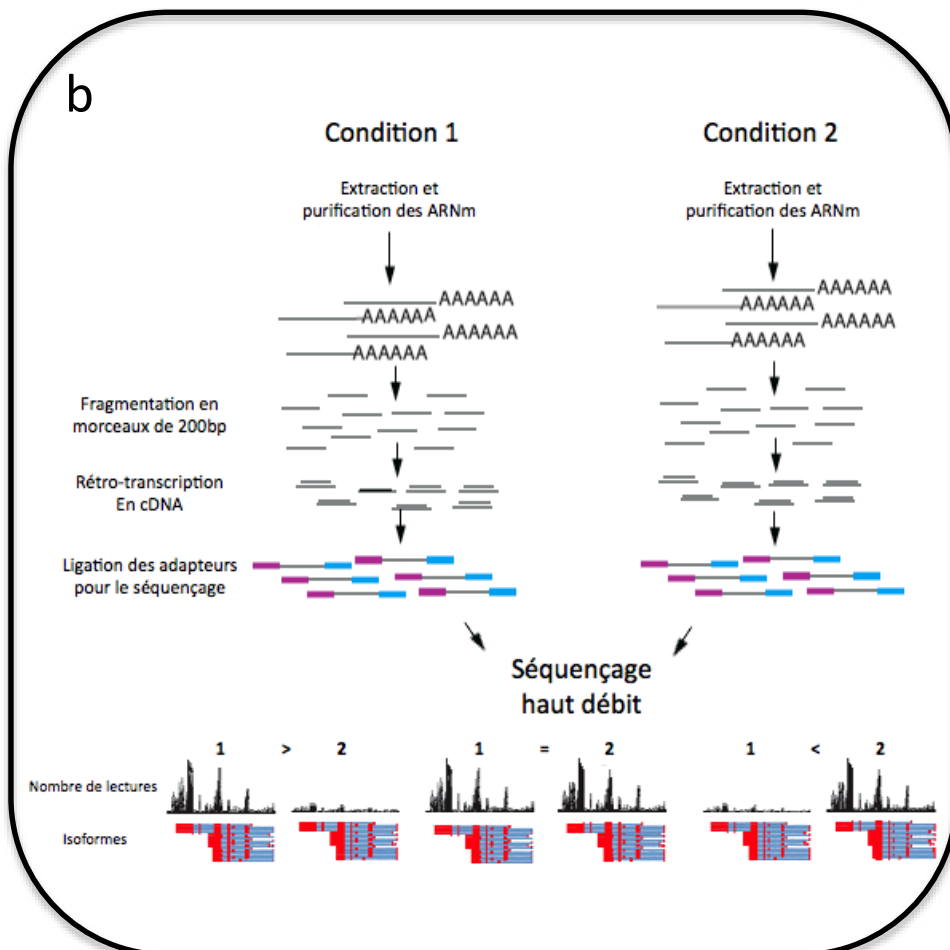


Figure 40. Protocoles d'analyse transcriptomique par puce à ADN (a) et par RNA-Seq (b)

Modifié de Malone et Oliver, 2011.



celles des FGFs, de Pax2 et de Hoxa1 dans r3-r5 chez la souris (Bouchard et al., 2005; Urness et al., 2010; Makki and Capecchi, 2011) ou des Pbx et de Hoxb1a dans r2 et r4 chez le poisson-zèbre (French et al., 2007; Rohrschneider et al., 2007). Certaines études analysent parfois aussi le résultat d'un gain de fonction, comme pour l'identification des cibles de Hoxb1b (Choe et al., 2011), ou comparent gain et perte de fonction, comme pour l'analyse des gènes de réponse à l'AR chez le xénope (Arima et al., 2005).

Enfin, l'expression des gènes dans différents tissus a également parfois été comparée à l'aide de puces à ADN dans le cas de l'étude des gènes impliqués dans le développement de l'oreille interne (Paxton et al., 2010) ou de l'étude des cibles des gènes Hox en comparant l'expression de tous les gènes dans chaque rhombomère à 9,5 jpc (Chambers et al., 2009).

L'une des difficultés majeures liées à l'étude du rhombencéphale et utilisant les puces à ADN est la très faible quantité de tissus – et donc d'ARNs – disponibles, tout particulièrement dans les stades précoces de début de segmentation. Cette faible quantité limite la fiabilité des résultats, en particulier dans le cas des FTs qui sont des gènes exprimés à des niveaux relativement faibles même quand ils sont fonctionnellement actifs. C'est la raison pour laquelle la plupart des études se concentrent sur des stades tardifs, sur des embryons entiers et/ou de poulet (plus grands). Comme nous allons le voir, le RNA-Seq permet de contourner cette difficulté, non pas tant en diminuant la quantité de matériel requise qui est du même ordre de grandeur que pour les puces à ADN, mais en produisant des résultats remarquablement fiables même pour des gènes faiblement exprimés.

IV.2. RNA-Seq : Principe et avantages

IV.2.a) Principe

Le RNA-Seq est l'acronyme anglais pour séquençage d'ARN et permet d'élaborer le répertoire transcriptomique d'une cellule ou d'un tissu en séquençant ses ARNs après rétrotranscription (pour revues: Wang et al., 2009; Marguerat and Bähler, 2010), là où les puces à ADN reposent sur l'hybridation des ADNc. Le développement de cette technologie repose sur l'avènement du séquençage haut débit dont le principe est de séquencer en parallèle plusieurs millions de fragments d'ADN sur des distances limitées

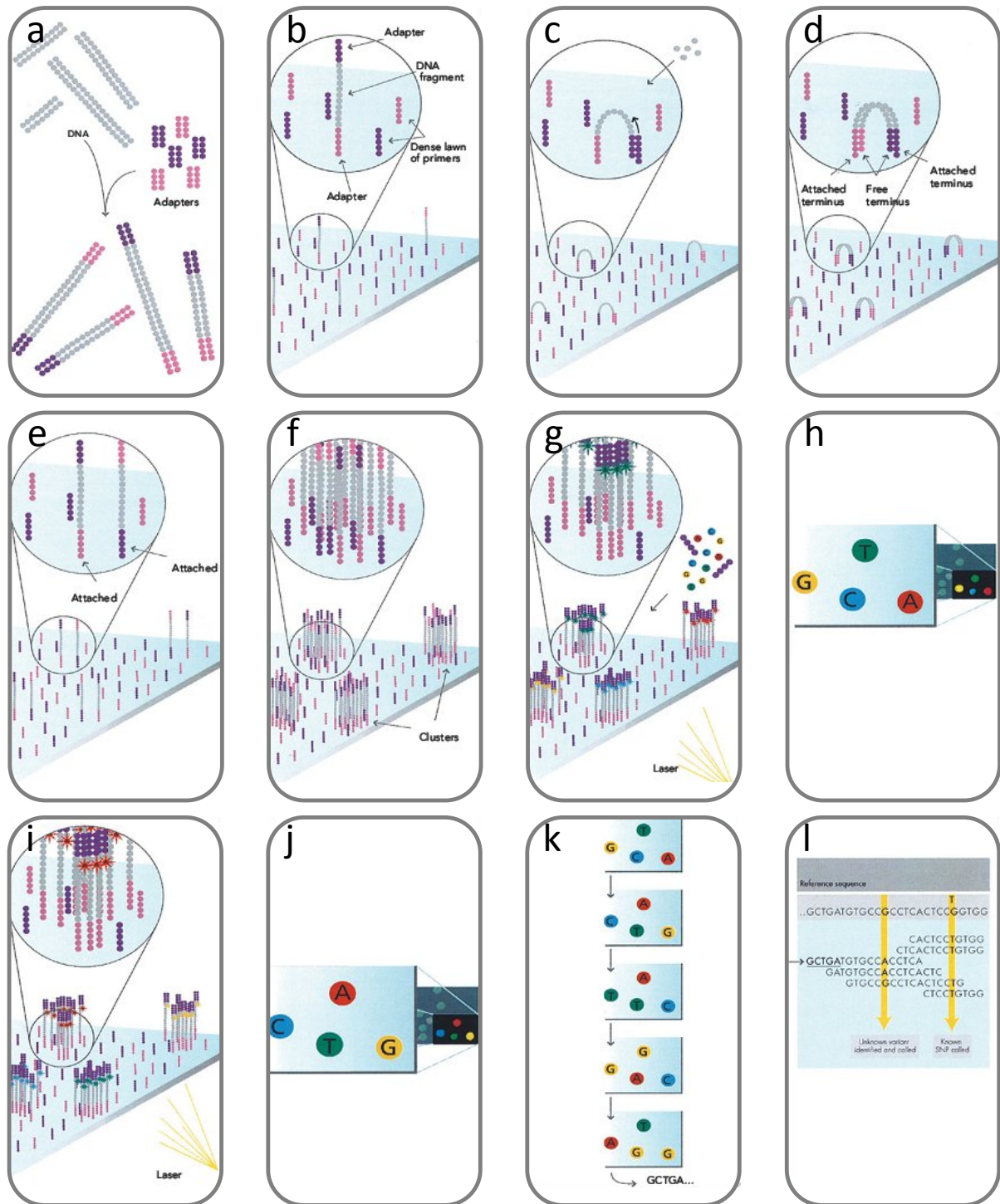


Figure 41. Etapes de séquençage haut débit pour la technologie Illumina® (Solexa®)

À chaque extrémité des fragments d'ADNc sont ligués des adaptateurs (a) qui vont permettre d'une part aux brins de se lier à la plaque de séquençage ('flow-cell') par hybridation à des adaptateurs complémentaires attachés à la flow-cell (b) et d'autre part à chaque brin individuel d'être amplifié localement par PCR (c-e) jusqu'à obtenir un cluster de clones (f) dont le séquençage simultané produira un signal détectable. Le séquençage repose sur l'incorporation séquentiel de nucléotides fluorescents par la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire au brin séquencé (g). Chaque nucléotide incorporé possède également un terminateur chimique réversible bloquant la suite de la synthèse. À chaque étape, une image des nucléotides fluorescents incorporés au niveau de chaque cluster est enregistrée (h), puis le fluorophore et le terminateur sont dissociés du nucléotide et un nouveau cycle d'incorporation de nucléotides fluorescents et de prise d'image est enclenché (i, j). Ce cycle est répété 30 à 100 fois et la succession de signaux fluorescents en un même point de la plaque est traduit en une séquence (k) qui est ensuite alignée sur le génome de référence pour déterminer à quel gène elle correspond (l). D'après les données constructeur.

(30-400 pb). Les principales étapes du séquençage haut débit sont présentées dans la figure 41 dans le cas de la technologie Illumina®, qui est celle exploitée pour le projet présenté dans ce manuscrit, mais les autres technologies de séquençage utilisées pour le RNA-Seq, si elles varient dans les détails et paramètres, suivent un principe similaire. Le séquençage haut débit a permis de réduire considérablement aussi bien le temps que le coût de séquençage et d'envisager ainsi son incorporation dans divers protocoles, dont l'analyse transcriptomique.

Celle-ci a suivi les étapes suivantes dans notre étude (figure 40) : extraction de l'ARN, purification des ARNm, fragmentation des ARNm en morceaux d'environ 200 pb, rétro-transcription en ADNc et ligation d'adaptateurs qui vont permettre le séquençage sur 65 pb. Les lectures ainsi réalisées (de l'ordre de la centaine de millions) sont ensuite alignées informatiquement sur le génome de référence. Chaque gène va se voir associer à un certain nombre de lectures qui reflète son niveau d'expression dans la cellule ou le tissu d'où a été extrait l'ARN.

Les premières études utilisant le RNA-Seq pour réaliser des analyses transcriptomiques ont été publiées en 2008 (Nagalakshmi et al., 2008; Wilhelm et al., 2008) et aujourd'hui plus de 900 articles décrivent des résultats en se basant sur cette technique.

IV.2.b) Avantages et exploitations

IV.2.b)α : sensibilité et quantitativité

Les deux avantages majeurs du RNA-Seq par rapport aux puces à ADN et qui concernent cette étude en premier lieu sont d'une part sa grande sensibilité et son large champ de détection, et d'autre part son aspect hautement quantitatif. En effet, les puces à ADN reposent sur la lecture de la fluorescence émise par les étiquettes accrochées aux ADNc hybridés aux sondes. Cette propriété impose des limites de détection pour les quantités trop faibles qui ne se détacheront pas suffisamment du background lumineux et pour les quantités trop importantes qui produiront un signal saturant. La fenêtre de détection couvre environ deux ordres de grandeurs (rapport 1 à 100 ou quelques centaines entre les gènes détectés les plus faiblement et les plus fortement exprimés). Le RNA-Seq, puisqu'il repose sur le décompte des lectures, n'a pas de limite supérieure de détection et n'est virtuellement pas limité non plus pour la détection des gènes

faiblement exprimés. La sensibilité va dépendre du nombre total de lectures réalisées. Plus celui-ci sera important, plus la proportion d'ARN séquencés parmi le pool total d'ARN extrait sera importante et plus les gènes faiblement exprimés seront détectés à des niveaux dépassant le seuil de fiabilité. En conséquence, la fenêtre de détection pour le RNA-Seq est bien plus large, couvrant cinq ordres de grandeurs pour une étude chez la souris utilisant un nombre total de 40 millions de lectures (Mortazavi et al., 2008). La nature du RNA-Seq est également intrinsèquement quantitative tandis que les puces à ADN nécessitent de traduire l'intensité d'un signal lumineux en termes quantitatifs.

IV.2.b)β : exploitations

Au delà de la quantification du niveau d'expression des gènes, le RNA-Seq permet d'avoir accès à un certain nombre de données permettant d'affiner les connaissances sur les génomes des différents organismes utilisés et leur expression.

Par exemple, la résolution du RNA-Seq au nucléotide près permet son utilisation pour la détermination du TSS des ARNs, cette technologie permettant de circonvier aux artefacts de la technique de CAGE (« Cap Analysis of Gene expression ») et de ses dérivés. De même, le RNA-Seq permet la détermination des frontières exactes des exons.

Un autre des grands intérêts du RNA-Seq est de pouvoir caractériser les différentes isoformes de transcrits provenant d'épissage alternatifs et leurs niveaux d'expression, une proportion importante des pathologies caractérisées résultant de mutations modifiant l'épissage (Wang and Cooper, 2007). Des améliorations récentes permettant des lectures plus longues ainsi qu'un séquençage de chaque côté du fragment d'ADNc de 200bp (dit « paired-end reads ») augmentent encore le potentiel du RNA-Seq dans ce domaine.

Le paired-end reading permet également de conserver l'information directionnelle, c'est-à-dire la connaissance du brin d'ADN dont provient le transcrit séquencé, par ligation d'adaptateurs différents de chaque côté de l'ADNc. Cette information est indispensable pour détecter les transcrits antisens qui sont des ARNs la plupart du temps non codants et synthétisés à partir de la séquence complémentaire de gènes codants, le plus souvent actifs. Longtemps considérés comme artefactuels, les études transcriptomiques récentes ont mis en évidence leur prévalence et leur implication dans des processus biologiques variés (Faghihi and Wahlestedt, 2009). D'autres techniques sont aussi utilisées pour conserver l'information directionnelle,

comme le marquage chimique d'un des deux brins ou l'utilisation d'actinomycine D qui inhibe l'activité ADN-polymérase ADN-dépendante des reverse-transcriptases.

Enfin, le RNA-Seq ne requiert pas de connaissances *a priori* autres que le séquençage du génome (et même cette nécessité peut-être contournée) et permet ainsi de découvrir de nouvelles unités de transcription, codantes ou non.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Constructions plasmidiques

Toutes les séquences dont l'activité transcriptionnelle a été testée proviennent du génome de poulet et ont été insérées dans des systèmes rapporteurs de type séquence testée-promoteur minimal de la β globine-gène de protéine fluorescente. Pour Cinit, le gène de la EGFP (pEGFP-N1) ou de la tagRFP (Evrogen®, notée RFP dans les résultats) a été inséré en lieu et place du gène *LacZ* (sites NcoI, HpaI) dans le plasmide pBGZ40 (Yee and Rigby, 1993) au sein duquel Cinit a été préalablement cloné comme décrit précédemment (Wassef et al., 2008). Pour Ccœur, C-2kb et C-1,5kb, les produits de PCR obtenus avec les primers décrits dans le tableau ci-dessous à partir du BAC121, utilisé ici : Chomette et al., 2006, ont été insérés après digestion par EcoRI dans le vecteur pBGZ40 (Yee & Rigby, 1993; sites EcoRI, EcoRV) au sein duquel le gène *LacZ* a été remplacé par le gène de la EGFP ou de la tagRFP (Evrogen®)(sites NcoI, HpaI)(vecteur GFP-pBGZ40 ou tgRFP-pBGZ40). Pour la génération des lignées transgéniques de poisson de la figure 43, la séquence Ccœur ou Cinit a été clonée en amont du gène *Gfp* dans un vecteur modifié pTol2 (Stedman et al., 2009). Les délétions de la séquence Ccœur ont été obtenues par PCR du vecteur décrit précédemment (Ccœur-GFP-pBGZ40) à partir des oligos décrits dans le tableau ci-dessous puis autoligation, sauf Ccœur-del1 qui a été obtenu par digestion du vecteur Ccœur-GFP-pBGZ40 par AflII et BstXI puis autoligation après incubation avec le fragment de Klenow en suivant le protocole du fabricant (Biolabs®). L'ensemble des mutations décrites ont été obtenues en utilisant le kit de mutagenèse du fabricant Finnzymes® (Phusion™ site-directed mutagenesis kit) avec les oligos décrits dans le tableau ci-dessous et à partir du vecteur Ccœur-GFP-pBGZ40. Le vecteur utilisé pour la surexpression de *Hoxb1* murin est le même que décrit précédemment (Wassef et al., 2008). Le plasmide de surexpression de Sp5 a été construit en clonant la partie codante de l'ADNc SP5 de souris avec une étiquette HA placée juste avant le codon stop dans le vecteur pAdRSVSp (Giudicelli et al., 2002). Le plasmide SP5En a été obtenu en fusionnant le domaine répresseur d'Engrailed (acides aminés 1-298) à la partie C-ter de SP5 (acides aminés 266-398) suivi du transfert dans le vecteur pAdRSVSp. Les constructions Ccœur[inv] et Ccœur-del1+2+3+4[inv] ont été obtenues par digestion par EcoRI et SacI des fragments PCR obtenus avec les oligos décrits dans le tableau ci-dessous à partir respectivement de Ccœur-GFP-BGZ40 et Ccœur-del1+2+3+4-GFP-pBGZ40 puis ligation au sein de ces mêmes vecteurs en lieu et place des séquences Ccœur ou Ccœur-del1+2+3+4 (sites EcoRI, SacI). La construction Cinit[inv] a été obtenue par digestion par EcoRI et XmaI des fragments PCR obtenus avec les oligos décrits dans le tableau ci-dessous et à partir du vecteur Cinit-GFP-pBGZ40 puis clonage dans le vecteur GFP-pBGZ40 (sites EcoRI, XmaI). Pour toutes les constructions, les jonctions de clonage et les mutations ont été vérifiées par séquençage.

séquence testée	oligos
Ccœur	TACGAATTCTGAGTACTGAATGTGCAGAGTTTGGC TACGAGCTCACCCAAGACAGTCCCGCAGT
C-2Kb	TACGAATTCTGAGTACTGAATGTGCAGAGTTTGGC TACGAGCTCTCGTTGTGCAGAAGACCCAAGCA
C-1,5kb	TACGAATTCTGAGTACTGAATGTGCAGAGTTTGGC TACGAGCTCAGCTGTTACTGTCATCAACCAGGTTTC
Ccœur-del2	TTCAAACAGGACTCAGATGAG ACAGTATCTCTTATTTCTGTT
Ccœur-del3	CAAAAATGAGCTGTACTIONTCA AACCTATGATTCATCAT
Ccœur-del4	AGTACTCAGAATTCCTGCAGC TTGTTGTTAGGCAAAACATGC
Ccœur-del1a	GCAACGCAGAGGGGCAGCTTCCTCA GTGTCAAGCGTTTTTCAGGCCATCCA
Ccœur-del1b	TACAGTGGAAAGCATTGAGAATGTT TGCTGACAGCTGAAGGAAGTGTGTC
Ccœur-del1a.1	CTGCCAGCTTCAAGCAAATAATGCT GTGTCAAGCGTTTTTCAGGCCATCCA
Ccœur-del1a.2	TTCGCTTTAGCATAGCCATCCTCCT GCAACGCAGAGGGGCAGCTTCCTCA
Ccœur-mutPou	CCTCCATCCCTAATGCTCTACACAGCAAGCTGACA GCTGGCAGTTCGCTTTAGCATAGCC
Ccœur-mut₇₇₄₋₇₉₀	CCCGAAGGACTGCCGACAACATGGAAGAGTGCTTCTT CTGAGAGCATGAAGTACA
Ccœur-mutHP1	TAATCACTGAGTAAACTGAACA GTCGACATTTGGAAAGGTTCTGCTG
Ccœur-mutHP2	GGATGGCCTGAAAACGCTTGA GTCGTCTTTGGTTGTTCCACCCACC
Ccœur-mut3Meis	CACTAGTTCTAGAGGTCGACCCACCGCGGTG GTGAACAACCTCCGGATCCGGTAATCCGGAAGGGAAGGC
Ccœur-mutMeis1	CCGGATGACATAATGACAAAGGGAAGGCA AGTTGTTCAAGTTTACTCAGTGATTA
Ccœur-mutbHLH	AACAACAAAGTAATACCCCTTTTCTGTTTTT TTTCTCTCTGATTAGTTAAAGCC
Ccœur-mutbHLH2	ACAACAGCCATTGTGGCTTTAACTAATCAGA CTGAGTCTTTGTTTGGGCTTCTTCT
Ccœur-mutbHLH3	ACAACATCAGCAGCAACGCAGAGGGGCAGCT AAGGAAGTGTGTCAGCTTGCTGTGT
Ccœur-mutSP	ACAAACAACACAACCAAAGAAGATGGATGG CCATGCTCGAGCCAC
Ccœur[inv]	AATGAATTCCTCACCCAAGACAGTCCCGCA ATTGAGCTCTTCTGAGTACTGAATGTGCAG
Ccœur-del1+2+3+4[inv]	AATGAATTCCTCACCCAAGACAGTCCCGCA ATTGAGCTCTTCTGAGTACAAGTGTCAAGC
Cinit[inv]	TACCCCGGGTCGAGGTCGATCTGAAAGCATGGA ATCCCGGGGCTGCAGGAAT

II. Alignements et profils de conservation

Les profils de conservation des séquences entourant et incluant l'élément C ont été obtenues à partir du Genome Browser (Kent et al., 2002, <http://genome.ucsc.edu/>). Les alignements ont été réalisés à partir du logiciel ClustalW du serveur de l'EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) et la mise en forme à partir du logiciel Boxshade du serveur Mobylye (Néron et al., 2009, <http://mobylye.pasteur.fr/>).

III. Électroporation *in ovo* chez le poulet

L'activité transcriptionnelle des séquences présentées en I. a été testée systématiquement par électroporation chez le poulet. L'ADN à l'état épisomal est injecté en solution (1mM Tris pH7,5, 0,025mM EDTA, Fast Green 0,03%) à l'aide d'un capillaire dans la lumière du tube neural d'embryons à HH8-9 (4-8 ss). Une série de 5 impulsions électriques d'une tension de 21V est appliquée sur l'embryon grâce à des électrodes placées sur la membrane vitelline de part et d'autre de l'axe AP. Cela entraîne la migration des molécules d'ADN vers le pôle positif et la déstabilisation des membranes cellulaires qui permet la transfection hémilatérale de l'embryon au niveau des cellules neuroépithéliales par l'ADN utilisé. Dans les expériences présentées, le côté transfecté est systématiquement à gauche et le côté contrôle à droite (le pôle antérieur des embryons est vers le haut). L'ADN injecté est à une concentration de 1µg/µL pour toutes les constructions contenant la GFP, 2µg/µL pour celles contenant la tagRFP, 0,2µg/µL pour le vecteur permettant la surexpression de Hoxb1 et 0,15µg/µL pour les vecteurs contenant les versions sauvages ou modifiées de SP5.

Les embryons sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h (stade 24-28 ss) et prélevés et disséqués pour observation directe sous microscopie à fluorescence. Les photos ont été prises à des temps d'exposition auto-ajustés selon le signal fluorescent. Le nombre d'embryons observés (N) est indiqué en légende de chaque figure ainsi que le positionnement des rhombomères (r), repérés à l'aide de l'emplacement de la vésicule otique située au niveau de r5/r6. La quantification de l'intensité en figure 44 a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

IV. Lignées transgéniques murines et ichthyennes et hybridation *in-situ*

Les lignées transgéniques de poisson-zèbre décrites en figure 43 ont été obtenues par Charlotte Labalette-Peaucele en injectant des embryons au stade 1 cellule avec chacun des vecteurs décrits en I. et de l'ARNm *tol2 transposase*. Les expériences de simple et de double hybridation *in-situ* chez le poisson ont été réalisées comme décrit précédemment (Hauptmann and Gerster, 1994) avec une sonde ARN *Krox20* de poisson-zèbre (Oxtoby and Jowett, 1993) et une sonde ARN *Gfp* obtenue par transcription du plasmide pEGFP-N1 avec l'enzyme T3 préalablement linéarisé par EcoRI.

Les lignées transgéniques murines de la partie IV sont les suivantes : *Krox20*^{KO} désigne la lignée *Krox20*^{GFP(DT)} (Vermeren et al., 2003), *Krox20*^{ΔC} a été obtenu selon un

protocole désigné en IV.1 par l'Institut Clinique de la Souris (Ilkirch, France) de même que pour *Krox20^{ΔA}* (Bouchoucha et al., en préparation). Les primers utilisés pour génotyper les allèles *Krox20^{ΔC}* sont indiqués dans le tableau suivant. Les hybridations *in situ* chez la souris ont été réalisées comme décrit précédemment (Giudicelli et al., 2001) avec une sonde *mKrox20* (Wilkinson et al., 1989) et *mEphA4* (Gilardi-Hebenstreit et al., 1992).

lignée <i>Krox20^{Crelox}</i>	ACAGTTCCAGCAGGTGGCTTCCT GCCTCACCCGCCTCAGACTTATT
lignée <i>Krox20^{ΔC}</i>	TTAAGCAGAACGTGTCTTATTCCTCGG GCCTCACCCGCCTCAGACTTATT

RÉSULTATS

I. Redéfinition de l'élément C et caractérisation des séquences conservées

L'élément C est le seul élément initiateur caractérisé à être actif dans r3 et constitue donc un outil clé pour comprendre comment l'expression de *Krox20* est contrôlée dans ce rhombomère. Les travaux réalisés par Michel Wassef, précédent doctorant au laboratoire, ont montré que les facteurs Hox PG1, Meis et Pbx régulaient directement l'élément C (Wassef et al., 2008). Des facteurs additionnels sont cependant nécessaires pour expliquer le profil d'activité précoce de C, dont les travaux décrits dans cette partie montrent qu'il est restreint à r3 et r4 (voir I.2). En effet, les Pbx sont ubiquitaires tandis que l'expression des Hox PG1 et des Meis s'étend caudalement jusque dans la moelle épinière. Un répresseur exprimé caudalement à r4 et/ou un activateur dont la limite postérieure d'expression correspond à r4/r5 permettraient donc d'établir un mécanisme de mise en place de l'activité initiale de l'élément C dans r3 et r4.

Afin d'identifier de tels facteurs, une première approche entreprise au cours de mes travaux de thèse a été d'identifier des blocs de séquences fonctionnellement importants pour l'activité de l'élément C. Ces blocs sont susceptibles de constituer des sites de fixation à des FTs régulant *Krox20* dans r3 et leur mise en évidence est une première étape vers l'identification de tels facteurs régulateurs.

Préalablement à cette recherche de blocs fonctionnellement importants, j'ai redéfini les limites de l'élément C. En effet, l'élément C tel qu'utilisé jusque là était associé à une production transcriptionnelle faible, variable, souvent non restreinte caudalement, et plus forte dans r4 que r3 lors de l'utilisation du système d'électroporation de tube neural de poulet (Wassef et al., 2008), alors que *Krox20* n'est pas détecté dans r4. De plus, la disponibilité de nouveaux génomes de vertébrés séquencés a permis de mettre en évidence une région conservée dans le prolongement 5' de l'élément C.

L'intégration de cette région conservée à l'élément C renforce son activité dans r3, la fiabilise et la restreint, suggérant que celle-ci relaye l'action régulatrice de

nouveaux facteurs. Afin de remonter à ceux-ci, j'ai donc cherché à identifier quels blocs de séquences en particulier confèrent à l'élément C ses nouvelles propriétés.

J'ai également repris l'analyse des sites de fixation déjà caractérisés au cours d'études réalisées avec l'ancienne version de l'élément C. Mon objectif était d'une part de vérifier que cela ne remettait pas en cause les conclusions tirées lors de ces précédents travaux, en particulier à propos de la régulation par les Hox PG1, et d'autre part d'affiner l'analyse des phénotypes induits par la mutation de ces sites dans le contexte du nouvel élément C.

Enfin, j'ai focalisé une partie de mon étude sur un bloc responsable d'un renforcement de l'activité de C dans r3 et susceptible d'être fixé par des facteurs de type SP/KLF, et j'ai étudié en particulier l'action du facteur SP5 sur l'activité de l'élément C. Ces travaux réalisés avec le système d'électroporation chez le poulet ont constitué une approche préliminaire aux études approfondies par transgénèse chez le poisson incorporées dans les résultats présentés en III.

I.1. L'incorporation à l'élément C de séquences conservées voisines stabilise son activité et la renforce dans r3

L'alignement des séquences situées autour de l'élément C à partir des génomes de poulet, de mammifères, de xénope et de poisson-zèbre fait apparaître une région conservée d'approximativement 1 kb (figure 42.A). L'élément C tel qu'initialement défini (Cinit)(Chomette et al., 2006; Wassef et al., 2008) n'en recouvre qu'une partie d'environ 300 pb. L'ajout à l'élément C des 700 pb conservées du côté 5' produit un élément (C-1,5kb) dont le profil d'activité, suivi par électroporation d'un système rapporteur chez le poulet, est modifié (figures 42.B et 42.C). En effet, l'activité de Cinit est forte dans r4 et fortement variable dans la région r3-r5. De plus, elle est fréquemment associée à un signal non spécifique caudalement à r5. L'activité de C-1,5kb est nettement plus reproductible, restreinte à r3 et r4 et présente un signal renforcé dans r3 (pour comparaison des deux profils au sein d'un même embryon : figures 42.F-F''').

Une séquence minimale centrée sur la région conservée (Ccœur) produit le même phénotype (figures 42.D et 42.G-G'''), suggérant que la partie non conservée de Cinit ne

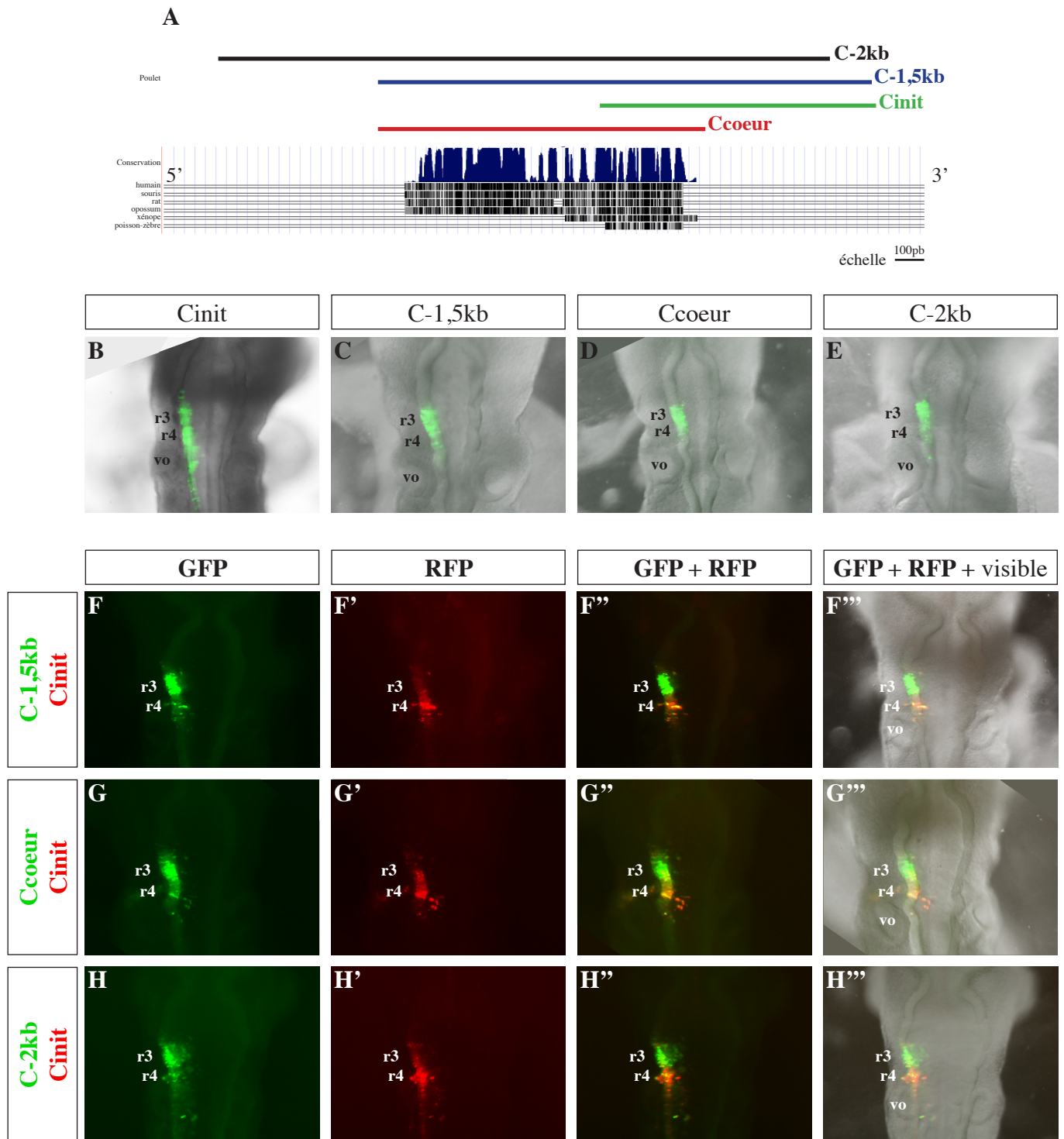


Figure 42. Redéfinition de l'élément C

A: Profil de conservation des séquences de poulet situées autour de l'élément C alignées avec celles de mammifères, de xénope et de poisson-zèbre (établi à partir du serveur Genome Browser (Kent et al., 2002)). L'histogramme bleu indique le score de conservation et les lignes grises sont des graphes de densité figurant la qualité d'alignement de la séquence de chaque espèce avec celle du poulet. Au dessus sont représentées les différentes séquences dont l'activité transcriptionnelle a été testée.

B-E: profil d'activité transcriptionnelle des séquences Cinit (B), C-1,5kb (C), Ccœur (D) et C-2kb (E) testées par suivi de la fluorescence de la protéine Gfp après électroporation d'embryons de poulet (Cinit: N>30, C-1,5kb: N=10, Ccœur: N>30, C-2kb: N=17). La position des rhombomères est indiquée (r) et repérée par rapport à la vésicule otique (vo) située au niveau de r5/r6

F-H''': comparaison des profils d'activité transcriptionnelle des séquences C-1,5kb (F-F'''), Ccœur (G-G''') et C-2kb (H-H''') clonées en amont du gène de la *Gfp* et de Cinit cloné en amont du gène de la *Rfp* électroporés ensemble dans le même embryon (F-F''': N=9; G-G''': N=11, H-H''': N=9).

possède pas d'activité transcriptionnelle. De même, un fragment de 2 kb centré sur Ccœur (C-2kb) a également été testé et présente le même profil d'activité que Ccœur et C-1,5kb (figures 42.E et 42.H-H''), confirmant que la séquence Ccœur inclut l'essentiel des instructions transcriptionnelles encodées dans la région et que l'élément C peut être assimilé à Ccœur.

1.2. La cinétique d'activité de l'élément C suit trois phases (figure 43)

L'établissement par Charlotte Labalette de lignées transgéniques chez le poisson-zèbre portant l'élément Ccœur de poulet cloné en amont du gène *Gfp* permet de suivre précisément son profil d'activité dans le temps par hybridation *in situ*, dès le démarrage de celle-ci. Il montre de plus que les mécanismes de régulation de l'élément C sont conservés entre les espèces, puisque c'est la séquence aviaire qui a été insérée dans le génome de poisson-zèbre. Le profil d'activité de l'élément C suit trois phases :

- l'activité de l'élément C commence à être détectée à 90-95% épibolie, avant que l'expression de *krox20* ne démarre, dans une bande qui préfigure les rhombomères 3 et 4 et dont l'intensité décroît selon un gradient rostro-caudal (figures 43.A et 43.B). Ce patron, cohérent avec le rôle de l'élément C d'initiateur de l'expression de *krox20* dans r3, va se renforcer progressivement jusqu'au stade tailbud, toujours selon le même gradient d'intensité (figures 43.C-D').
- à partir de la fin du stade tailbud, l'activité dans r3 se démarque de celle de r4 : elle est uniforme et renforcée dans r3 tandis qu'elle garde un profil en gradient rostro-caudal dans r4. Ce profil va rester le même jusqu'à 10 ss (figure 43.E-H'). Des travaux préliminaires réalisés par Charlotte Labalette suggèrent que, tardivement, ce renforcement dans r3 provient d'un mécanisme d'autorégulation de *Krox20* sur l'élément C, probablement indirect via les *Hox* PG2, puisqu'il n'est pas observé au sein de poissons mutants *krox20*^{-/-} à 8 ss. La situation est en revanche moins claire à 2 ss, car le profil de C chez les mutants ne semble pas différent de celui des animaux sauvages.

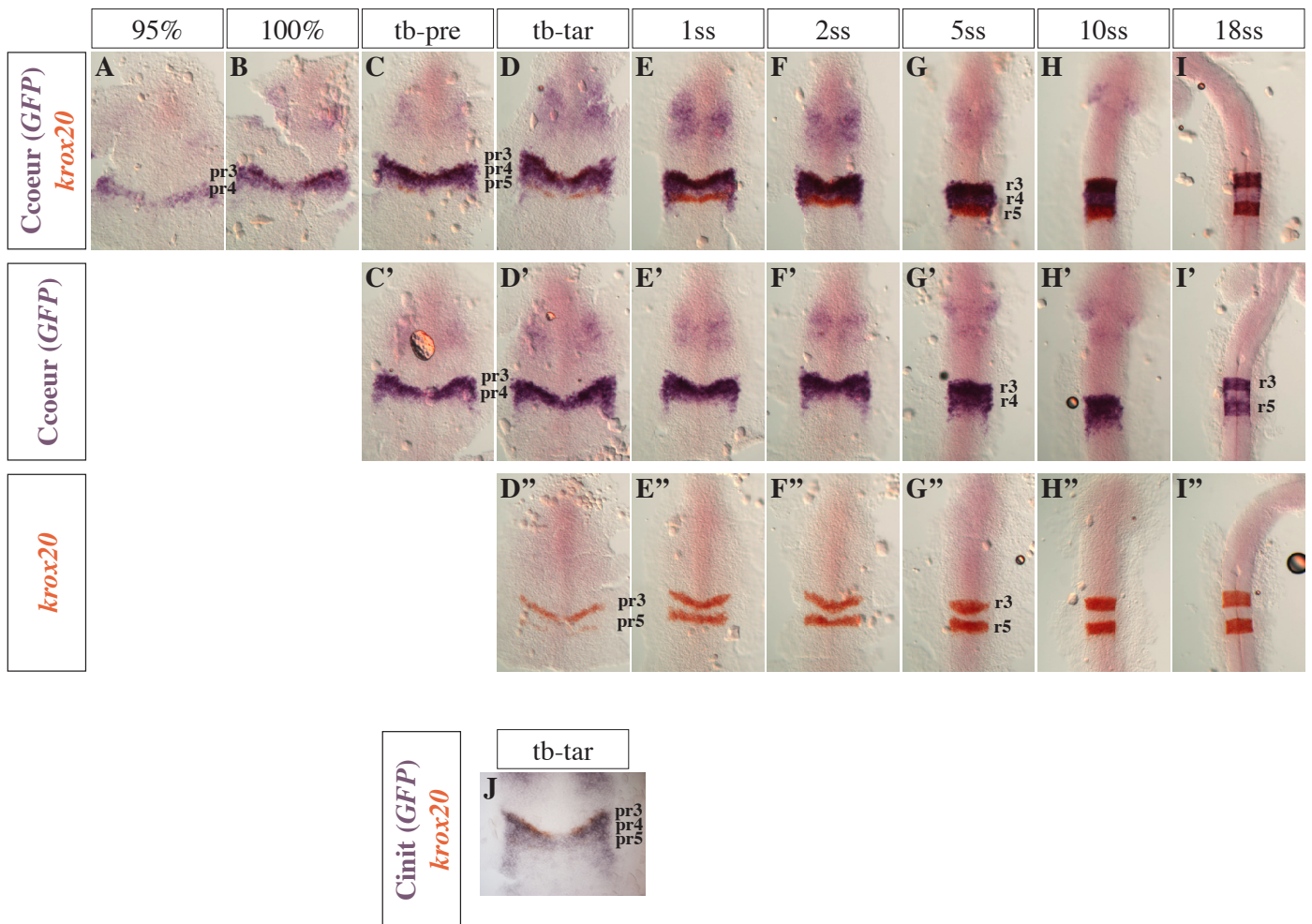


Figure 43. Cinétique d'activité de l'élément C et d'expression de *krox20*

Cinétique d'activité de l'élément C et d'expression de *krox20* suivies par hybridation in situ contre l'ARN *Gfp* (violet) ou *krox20* (orange) dans des poissons-zèbres transgéniques portant la séquence Ccoeur (A-I) ou Cinit (J) en amont du gène de la *Gfp*. Le profil d'activité de l'élément C seul (C'-I') ou d'expression de *krox20* seul (B''-I'') est également montré. Les embryons sont montés à plat.

pr : pré-rhombomère, r : rhombomère, ss : stade somitique, tb-pre : stade pré-tailbud, tb-tar : stade tailbud tardif

- entre les stades 10 et 18 ss, l'activité de l'élément C enclenche la troisième phase de sa cinétique : elle s'éteint ou est fortement réduite dans r4 et est détectée dans r5 (figure 43.I), bien après que *krox20* ait commencé à être exprimé dans ce rhombomère (figures 43.D''-I''), confirmant que l'élément B assure la plus grande partie – et potentiellement la totalité – du démarrage de l'expression de *krox20* dans ce rhombomère.

Par ailleurs, la comparaison des profils d'activité de Ccœur et Cinit au sein de ce système de lignées transgéniques confirme que les séquences ajoutées au Ccœur inhibe son activité postérieurement à r4 et le renforce dans r3 (figure 43.J à comparer avec 43.A).

1.3. Une séquence de 60 pb peu conservée confère à Ccœur ses nouvelles propriétés

L'élément C redéfini produit un profil d'activité modifié, en particulier renforcé dans r3 et restreint caudalement à r4. Parmi les séquences ajoutées se trouvent donc des sites de fixation reconnus par des FTs impliqués dans l'activation spécifique de *Krox20* dans r3 et son inhibition dans les régions postérieures. Pour progresser vers l'identification de ces facteurs, j'ai donc cherché à caractériser quelles séquences en particulier contenaient l'information responsable du profil de modifié de Ccœur.

Pour cela, j'ai divisé les séquences ajoutées en quatre zones baptisées del1, 2, 3 et 4 (figure 44.A) et j'ai testé les instructions transcriptionnelles portées par chacune d'entre elles en les excisant de la séquence Ccœur (Ccœur Δ delx, figures 44.B-F). Seule l'excision de la séquence del1 conduit à une modification importante de l'activité de Ccœur selon un profil qui ressemble fortement à celui de Cinit : le signal est peu restreint et plus fort dans r4 que dans r3. L'excision des séquences del2, 3 et 4 ne modifie pas le profil d'activité de Ccœur. Toutefois, dans le cas de del4 et surtout de del2, l'intensité du signal est diminuée (quantifiée en figure 44.L).

Étant donné que, d'une part, la combinaison des délétions 2, 3 et 4 ne modifie pas le patron d'activité de Ccœur (figure 44.K) et que, d'autre part, aucune activité transcriptionnelle associée au fragment 12.1 – contenant les séquences del2, 3 et 4 ainsi

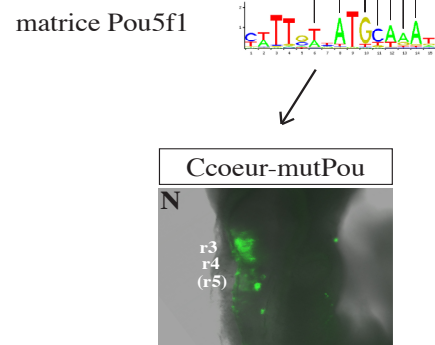
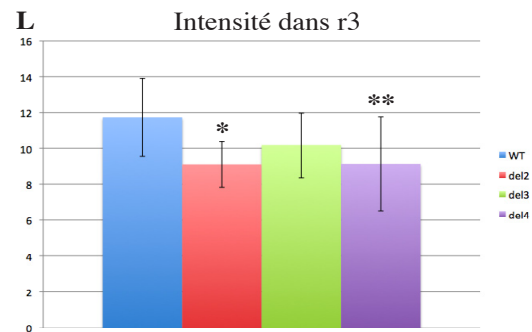
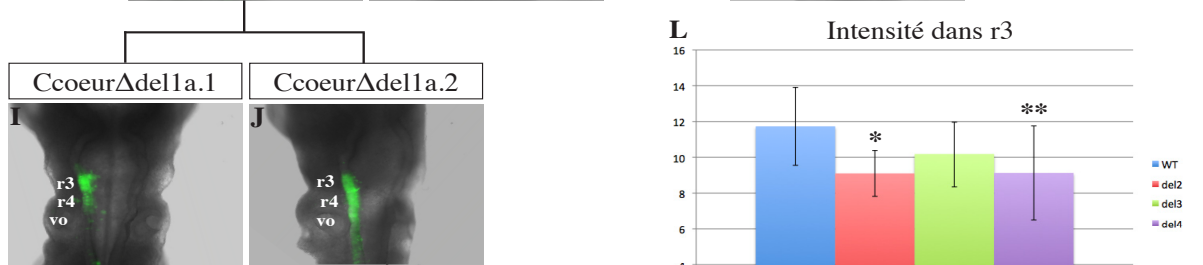
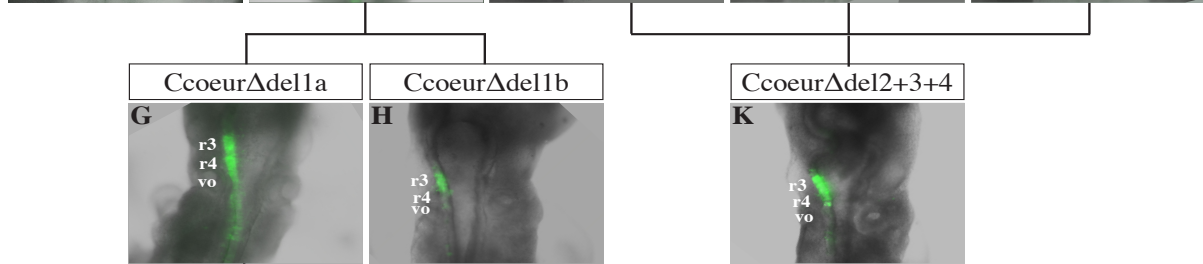
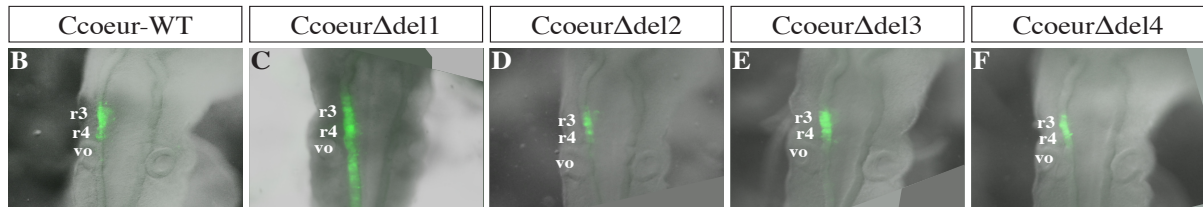
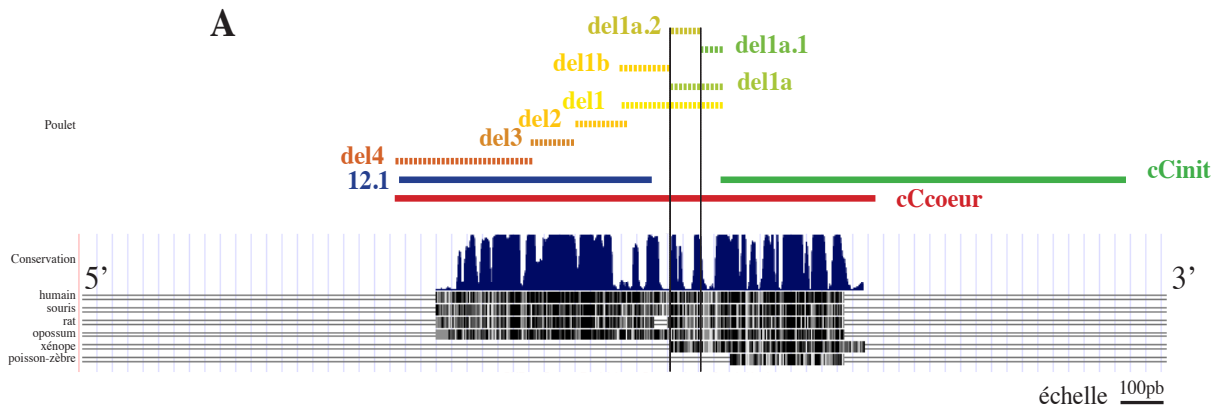


Figure 44. Caractérisation des séquences ajoutées au nouvel élément C

A: Représentation graphique montrant le profil de conservation des séquences autour de l'élément C et les différents fragments testés. Les fragments hachurés représentent les séquences qui ont été excisées du Ccoeur.

B-K: profil d'activité transcriptionnelle du Ccoeur amputé des séquences indiquées testé par suivi de la fluorescence Gfp après électroporation d'embryons de poulet (B: N>30, C: N>30, D: N=8, E: N=14, F: N=12, G: N>20, H: N>20, I: N=11, J: N=15, K: N=8). L: quantification de l'intensité de fluorescence mesurée dans les conditions D, E et F. * : p = 0,002 (test de Student), ** : p = 0,03.

M: Alignement des séquences correspondant au fragment del1a.2 à partir des génomes de mammifères, de poulet et de xénope faisant apparaître un bloc plus conservé pouvant correspondre à un site de fixation au facteur Pou5f1 (matrice représentée dessous). La mutation réalisée est indiquée au dessus. La séquence del1a.2 de poulet contient également une boîte E très peu conservée abordée dans la partie I.5.

N: profil d'activité transcriptionnelle du Ccoeur muté pour le site potentiel de fixation à Pou5f1 (N=15).

que 50 pb supplémentaires (figure 44.A) – n’est détectée par électroporation chez le poulet ou par transgénèse chez le poisson (résultats non montrés) ou chez la souris (Chomette et al., 2006), mes travaux se sont concentrés sur la séquence del1.

À travers deux subdivisions successives (figures 44.G-J), j’ai restreint à une séquence de 60 pb (del1a.2) la portion d’ADN responsable du renforcement d’activité de Ccœur dans r3 et de sa restriction à r3 et r4. L’alignement de génomes de mammifères, de poulet et de xénope (figure 44.M) montre que cette séquence n’est que faiblement conservée mais fait néanmoins apparaître un site potentiel de fixation au facteur Pou5f1 (Chen et al., 2008). La mutation de ce site n’est cependant pas suffisante pour modifier le profil d’activité de Ccœur (figure 44.N), le signal observé dans r5 étant également trouvé parfois avec la séquence Ccœur sauvage (voir commentaires). Des travaux sont en cours pour analyser l’effet de cette mutation au sein d’une lignée transgénique chez le poisson-zèbre, ce système permettant des observations plus précises (voir commentaires).

En conclusion, au sein des 700 pb ajoutées à l’élément C pour former la séquence Ccœur, un sous-fragment de 60 bp semble suffisant pour renforcer l’activité de celui-ci dans r3 et la restreindre postérieurement à r4. Ce sous-fragment contient un site potentiel de fixation aux facteurs Pou et ces derniers pourraient donc être impliqués dans la régulation de *Krox20*, et compléter celle relayée par les Hox, Pbx et Meis. Cependant, l’absence de phénotype évident associé à la mutation de ce site Pou suggère qu’un autre site est responsable de l’effet de la délétion de la séquence del1a.2, seul ou de façon redondante avec le site Pou.

I.4. Les sites Hox HP1 et HP2 sont nécessaires à l’activité de l’élément C et à la réponse à la surexpression de Hoxb1

En plus de la caractérisation des séquences ajoutées au nouvel élément C, une partie de mes travaux s’est concentrée sur l’étude des blocs de séquence conservés situés dans la partie commune à Ccœur et Cinit. Cette partie est en effet elle-même particulièrement conservée, jusqu’au poisson-zèbre, et regroupe plusieurs blocs complètement similaires chez les génomes des différents vertébrés étudiés (figure 45.A).

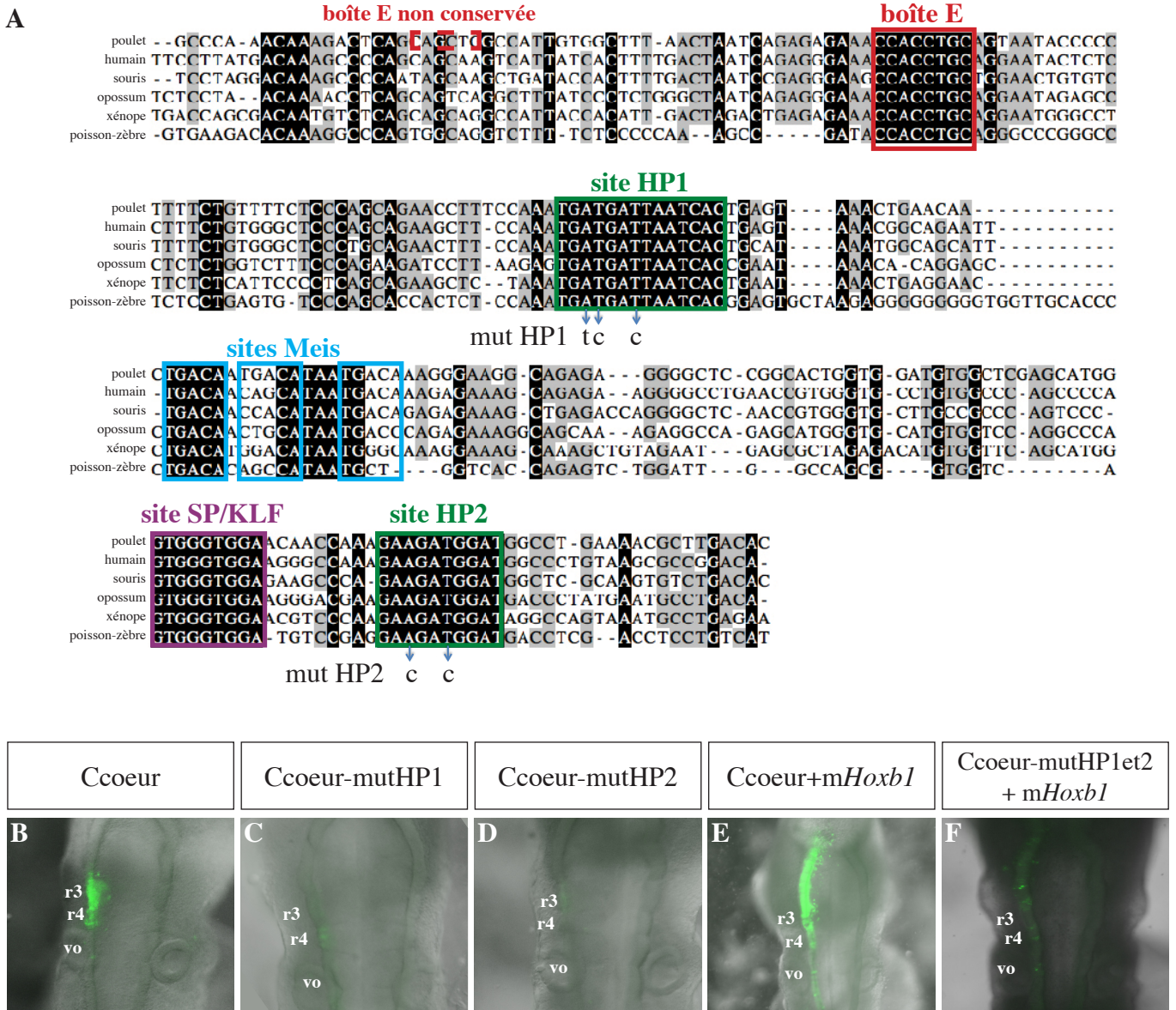


Figure 45. Rôle central des sites de fixation aux facteurs Hox/Pbx

A: alignement des séquences partagées entre Ccoeur et Cinit (seules les 280 pb les plus conservées sont représentées) à partir de génomes de mammifères, de poulet, de xénope et de poisson-zèbre faisant apparaître des blocs de séquence particulièrement conservés. Les mutations des sites HP1 et HP2 sont indiquées.

B-E: profil d'activité transcriptionnelle de la séquence Ccoeur sauvage ou mutée pour les sites indiqués, seul ou co-électroporé avec le facteur murin Hoxb1 (C : N=5, D : N=5, E : N=14, F : N= 7).

r : rhombomère, vo : vésicule otique

J'ai commencé par vérifier le rôle des sites bipartites de fixation aux facteurs Hox et Pbx HP1 et HP2, caractérisés par Michel Wassef comme étant central pour l'activité de l'élément C et relayant la régulation par les Hox PG1 (Wassef et al., 2008). Comme pour la séquence Cinit, la mutation du site HP1 ou HP2 abolit presque complètement l'activité de Ccœur (figures 45.B-D). De même, la séquence Ccœur est également fortement transactivée, en particulier antérieurement, par la co-électroporation avec le facteur murin Hoxb1 (figure 45.E). En revanche, ce n'est plus le cas si les deux sites HP1 et HP2 sont mutés (figure 45.F), ce qui suggère qu'il n'y a pas de sites additionnels reconnus par les facteurs Hox au sein des 700 pb ajoutées à l'élément C.

I.5. Les sites Meis, SP/KLF et la boîte E participent au renforcement de l'activité de l'élément C dans r3 et/ou sa répression dans r4

Trois autres blocs conservés se trouvent dans les séquences partagées entre Ccœur et Cinit (figure 45.A) : une boîte E susceptible de fixer des FTs de type bHLH (figure 46.B, Jones, 2004), un site potentiel de fixation aux facteurs SP/KLF (figure 46.H, Kaczynski et al., 2003) et une séquence de deux blocs conservés contenant trois sites de fixation aux facteurs Meis (figure 46.A, Mann and Affolter, 1998). Michel Wassef a montré que les facteurs Meis fixaient effectivement ces sites (Wassef et al., 2008) et que la mutation des 3 sites entraînait une perte d'activité de l'élément C spécifiquement dans r3. La mutation de ces sites sur la séquence Ccœur confirme ces résultats et montre également que le signal est renforcé dans r4 et globalement moins bien restreint (mut3Meis, figure 46.D). La mutation du premier site potentiel Meis seul est également associée à une diminution d'activité dans r3, par rapport à r4, (mutMeis1, figure 46.E), bien que moins marquée.

L'élément C contient également une boîte E très conservée dont l'étude a été initiée par Michel Wassef mais qui n'a pu être menée à terme du fait de la trop grande variabilité d'activité induite par Cinit. L'utilisation de la séquence Ccœur montre en fait que la mutation de ce site ne modifie pas le profil d'activité de l'élément C, évalué par électroporation chez le poulet (mutEbox, figure 46.F) et par l'établissement de lignées transgéniques chez le poisson-zèbre (non montré). La séquence aviaire de l'élément

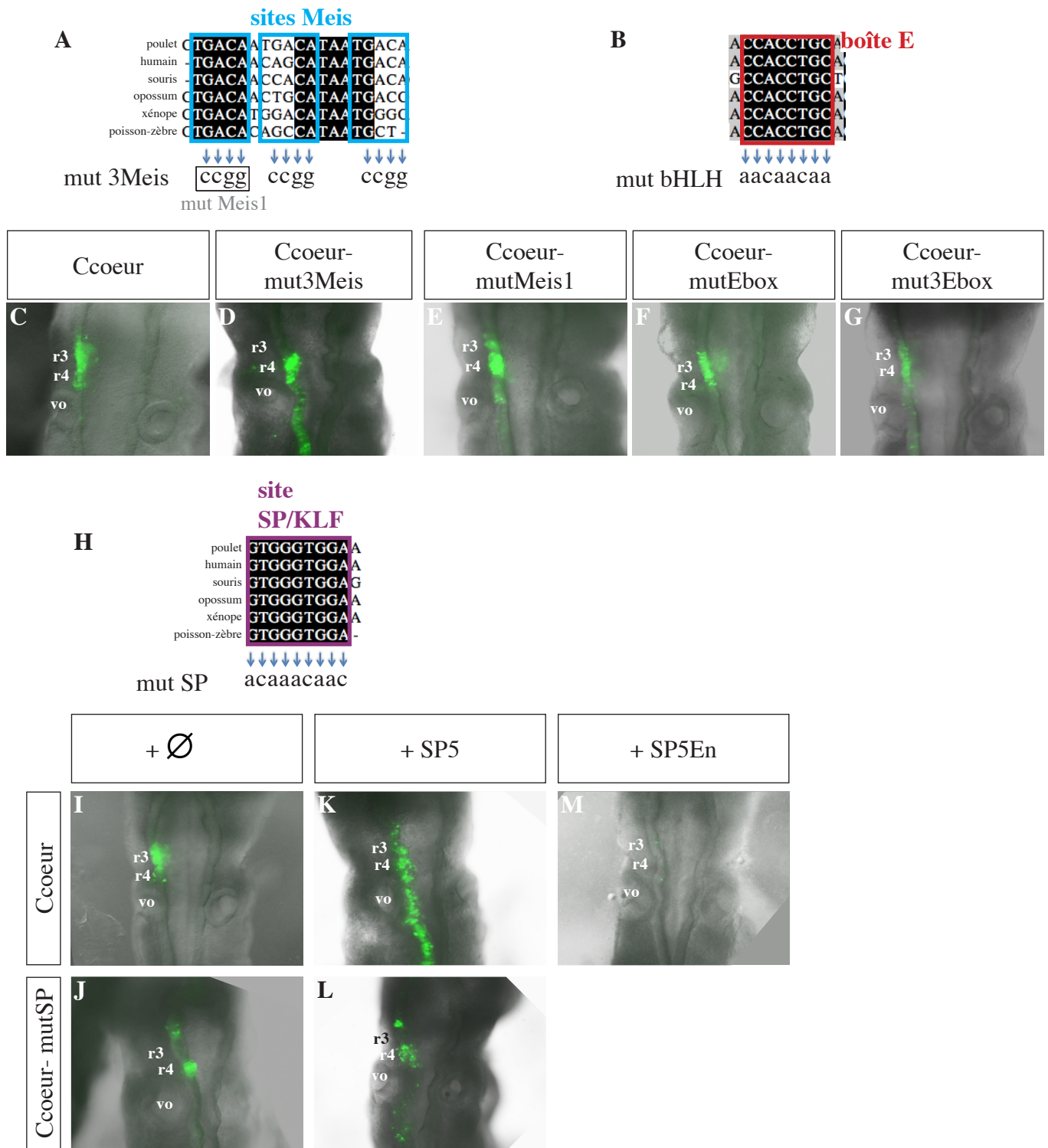


Figure 46. Rôle des sites conservés Meis, SP/KLF et de la boîte E

A, B, H: alignement des séquences de mammifères, de poulet, de xénope et de poisson-zèbre correspondant aux sites mentionnés. Les mutations réalisées sont indiquées en dessous.

C-G: profil d'activité transcriptionnelle de la séquence Ccoeur sauvage ou mutée (D: N=13, E: N=10, F: N=15, G: N=9)

I-O: profil d'activité transcriptionnelle de la séquence Ccoeur sauvage (I-L) ou muté pour le site SP/KLF (M-O), seule (I, M: N>25) ou co-électroporé avec des versions sauvage (J: N=>30, N: N=19), dominante négative (K: N=8, O: N=10) ou fusionnée avec un domaine répresseur (L: N=15) du facteur SP5.

r : rhombomère, DN : dominant négatif, En : domaine répresseur d'Engrailed, vo : vésicule otique

Ccœur contient cependant deux autres boîtes E, dont une située dans la séquence del1a.2, bien que celles-ci ne semblent pas ou peu conservées entre les différents groupes de vertébrés (figures 44.M et 45.A). Des résultats préliminaires suggèrent que la mutation combinée des trois boîtes E présentes sur Ccœur produit un phénotype de réduction d'activité dans r3 et/ou de renforcement dans r4 (mut3Ebox, figure 46.G). Bien que des données supplémentaires soient nécessaires pour confirmer ce résultat, cela suggère que l'élément C est régulé par des facteurs de type bHLH se fixant sur ces trois boîtes E.

Enfin, le site SP/KLF a également été étudié par Michel Wassef dans le contexte de l'ancien élément C et semblait nécessaire à son activité dans r3. Les travaux réalisés avec la séquence Ccœur confirment ces résultats et montrent également que la mutation du site SP/KLF aboutit un signal plus fort dans r4 et parfois également dans r2 (mutSP, figure 46.I,J).

Au sein de la famille SP/KLF, Sp5 est le seul membre décrit comme ayant un rôle dans la régionalisation du rhombencéphale (voir introduction). De plus, l'analyse transcriptomique du rhombencéphale présentée dans la partie suivante l'a identifié comme le facteur SP/KLF exprimé le plus différenciellement dans le rhombencéphale, par comparaison avec la partie antérieure du tube neural. Michel Wassef a montré que SP5 se liait à la séquence SP/KLF et que sa surexpression transactivait l'élément C sauvage, mais pas l'élément C muté pour ce site, ou de façon nettement moins efficace. J'ai confirmé ces résultats avec la séquence Ccœur (figures 46.I-L). J'ai également montré que la transactivation par Sp5 était liée à son action activatrice car sa fusion avec le domaine répresseur du facteur Engrailed l'abolit (figure 46.M).

En conclusion, les travaux sur le nouvel élément C confirment l'importance fonctionnelle des sites Hox/Pbx et Meis. Ils mettent également en lumière le rôle des boîtes E, reflétant probablement l'implication de facteurs de type bHLH dans la régulation de l'élément C, et du site SP/KLF dont la mutation abolit l'activité dans r3 et la renforce dans r4. Ce phénotype d'inversion du ratio d'activité r3/r4 suggère que ce site joue un rôle important puisqu'il pourrait être reconnu par un FT impliqué dans l'activation de *Krox20* antérieurement à la frontière r3/r4 et compléter ainsi le réseau régulateur formé par les Hox, Pbx et Meis dont l'expression dans les régions caudales ne permet pas d'expliquer le profil restreint de l'élément C et de *Krox20*. Un premier travail

avec le système d'électroporation de poulet, présenté ci-dessus, a permis de montrer que le facteur Sp5 régulait l'activité de l'élément C à travers la fixation sur le site SP/KLF. Ces données ont été confirmées et approfondies par des études chez le poisson-zèbre intégrées dans les résultats présentés dans le chapitre III.

I.8. Commentaires

Les travaux présentés dans cette partie visaient la caractérisation de blocs de séquence au sein de l'élément C susceptibles de constituer des sites de fixation à des facteurs régulateurs de *Krox20*. Puisque les régulateurs caractérisés Hox, Pbx et Meis sont tous exprimés caudalement à r3, l'objectif était de progresser vers l'identification de facteurs impliqués dans la répression caudale et/ou l'activation antérieure de C et de *Krox20* antérieurement à la frontière r3/r4. Les résultats obtenus mettent en évidence plusieurs séquences importantes pour la régulation de l'élément C et suggèrent l'implication de nouveaux FTs candidats discutés ci-dessous.

I.8.a) Les séquences ajoutées à l'élément C renforcent le ratio d'activité r3/r4

La redéfinition de l'élément C a permis de mettre en évidence le rôle de nouvelles séquences dont le rôle semble particulièrement important puisqu'elles renforcent l'activité transcriptionnelle de cet élément dans r3, là où il engage le démarrage de l'expression de *Krox20*, et la réduisent dans r4, là où *Krox20* n'est jamais détecté.

Parmi les séquences ajoutées, un noyau réduit de 60 pb (del1a.2) est nécessaire et suffisant pour conférer à la séquence Ccœur ses nouvelles propriétés. Il est intéressant de noter que cette partie des séquences ajoutées est la seule à être conservée avec le xénope (figure 44.A). Les autres séquences ne sont conservées qu'entre le poulet et les mammifères et leur action semble se limiter à augmenter globalement l'intensité de l'activité transcriptionnelle induite par l'élément C. En particulier, la difficulté d'isoler des blocs de séquence conservés dans ces régions et l'absence de phénotype marqué lié à leur excision ne permet pas la caractérisation de motifs importants pour l'activité de l'élément C et donc d'identifier les éventuels FTs en amont.

La séquence del1a.2 possède un bloc conservé en 5' pouvant correspondre à un site de fixation au facteur Pou5f1 (figure 44.M). Le rôle de ce facteur dans la segmentation du rhombencéphale, décrit en introduction, rend ce site particulièrement attrayant puisqu'il apporterait un mécanisme par lequel Pou5f1 régule *Krox20* et expliquerait la baisse d'expression très importante dans r3 de *Krox20* dans le mutant *spg*. Des expériences décrites dans le chapitre suivant montrent que la surexpression de Pou5f1 est capable de transactiver l'élément C. Des études plus approfondies seront réalisées à partir de lignées transgéniques de poisson portant l'élément C cœur muté au site Pou. Cette lignée transgénique permettra peut-être également de mettre en évidence un effet subtil de la mutation que le système d'électroporation de poulet n'a pas permis de détecter (voir I.8.c).

La séquence del1a.2 contient également un second bloc un peu moins conservé en 3' (figures 44.M et 47) dont le rôle n'a pas été examiné dans mes travaux. Ce bloc est néanmoins lui aussi potentiellement intéressant puisqu'il pourrait constituer un site de fixation aux facteurs Ets (figure 47, Portales-Casamar et al., 2007) et participer à la médiation de la régulation de *Krox20* par les FGFs à travers l'élément C.

Enfin, la séquence del1a.2 possède une boîte E, susceptible d'être reconnue par les facteurs de la famille bHLH. Bien que sa séquence nucléotidique ne soit que peu conservée entre les différents génomes de vertébrés, sa présence au sein de del1a.2 suggère un rôle possible dans la régulation de l'élément C. De plus, les résultats préliminaires de modification du profil d'activité de l'élément C suite à la mutation des trois boîtes E présentes sur la séquence aviaire de cet élément, dont une particulièrement conservée, permettent d'envisager l'implication de facteurs bHLH dans le contrôle transcriptionnel de *Krox20*.

I.8.b) Les séquences ajoutées inhibent l'activité de l'élément C dans la partie caudale

L'établissement de lignées transgéniques chez le poisson-zèbre portant l'élément C cœur a permis de suivre précisément la cinétique d'activité de cet élément par hybridation *in situ*. En effet, les cinétiques établies jusqu'ici reposaient sur l'utilisation du gène *LacZ* et le suivi de l'activité β -galactosidase. Celle-ci est moins fidèle d'une part

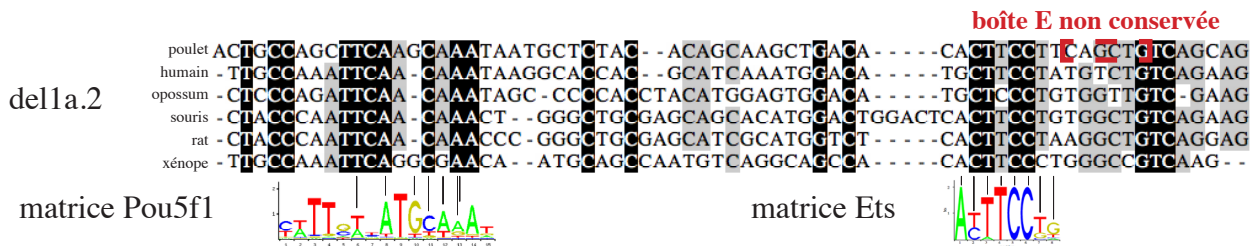


Figure 47. **Alignement des séquences correspondant à del1a.2 chez le poulet, les mammifères et le xénope et matrices de liaison à l'ADN des facteurs Pou5f1 et Ets**

La boîte E située dans le génome aviaire est indiquée

parce qu'elle nécessite l'accumulation d'un certain niveau de protéines pour devenir détectable, d'autre part du fait de la grande stabilité de la protéine.

Cette cinétique confirme le phénotype associé à l'élément Ccœur observé avec le système d'électroporation d'embryons de poulets : le renforcement dans r3 et l'inhibition dans la partie caudale du rhombencéphale. Elle montre en particulier que, contrairement à ce qui était observé avec l'élément incomplet Cinit, l'élément Ccœur n'est actif que tardivement dans r5, bien après que *Krox20* y soit exprimé. Il est donc fortement probable, que dans ce rhombomère, l'élément C ne participe pas au démarrage de l'expression de *Krox20* qui semble donc assuré exclusivement par l'élément B. L'activité de l'élément C est au contraire probablement régulée par *Krox20* de façon indirecte : *Krox20* active les *Hox* PG2 qui sont capables comme les *Hox* PG1 de lier et d'activer l'élément C (Wassef et al., 2008). Les mécanismes moléculaires régissant cette boucle d'autorégulation sont actuellement examinés dans le laboratoire par Charlotte Labalette et Carole Desmarquet.

Cette cinétique montre également que le profil initial d'activité de l'élément C suit un gradient d'intensité rostro-caudal. L'impact de ce profil en gradient sur l'expression de *Krox20* et sur la formation de r3 figure dans les résultats présentés dans la partie III et fait l'objet d'une partie importante de la discussion de ce manuscrit.

1.8.c) Contribution des différents blocs conservés

L'ancien élément C (Cinit) incluait les séquences les plus conservées – jusqu'au poisson-zèbre – et en particulier un ensemble de blocs très conservés jouant un rôle central dans la modulation de l'activité de l'élément C. La redéfinition de l'élément C a permis d'affiner l'étude des mutations de ces blocs puisque l'ancien élément C produisait un phénotype d'activité de type « muté », c'est-à-dire affaibli dans r3 et renforcé dans r4.

L'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre semble définir l'élément C comme étant constitué de deux sortes de sites aux fonctions distinctes. D'une part, les sites *Hox*/*Pbx* sont absolument nécessaires à l'activité de l'élément C et induisent celle-ci par défaut dans r4 et postérieurement, selon un profil très similaire à l'expression de *Hoxb1* en début de segmentation. D'autre part, les sites *Meis*, *SP*/*KLF*, les boîtes E et les séquences contenus dans la *del1a.2* participent collectivement au renforcement de l'activité de l'élément C dans r3, à son affaiblissement dans r4 et à sa répression

postérieurement à r5. En effet, les mutations de chacune de ces entités aboutissent à un profil d'activité similaire tendant vers le profil d'expression de *Hoxb1*.

Les expériences de transactivation par le facteur murin *Hoxb1* de l'élément C muté aux sites HP1 et HP2 suggèrent qu'il n'y a pas d'autres sites de fixation aux facteurs Hox/Pbx. La perte d'activité de l'élément C produite par la mutation de chacun des deux sites montre que leur présence combinée est nécessaire.

La mutation du premier site Meis semble produire un phénotype similaire à celui de la mutation des trois sites Meis (figure 46.D,E), bien que légèrement moins prononcé. Il serait intéressant de déterminer si les deux autres sites Meis participent de la même manière à l'activité de l'élément C ou si le deuxième bloc conservé constitue un autre site, ce que suggère le fait que, contrairement au premier site Meis parfaitement conservé, il ne recouvre pas complètement les deux autres sites (figure 45.A). La mutation ciblée de ce site et/ou des nucléotides des deux autres sites Meis situés à l'extérieur du bloc conservé permettrait de répondre à cette question et de déterminer l'importance fonctionnelle de ce deuxième bloc.

Les travaux réalisés sur le site SP/KLF montrent que le facteur Sp5 module l'activité de l'élément C et constitue donc vraisemblablement un régulateur de *Krox20*. Son rôle est potentiellement important puisque la mutation du site SP/KLF abolit fortement et spécifiquement l'activité de l'élément C dans r3. Les résultats présentés en III montrent que le facteur Sp5 relaie l'action de la signalisation FGF sur l'élément C. Un modèle décrivant comment l'activité de ce facteur et des autres régulateurs caractérisés ou potentiels met en place le profil d'activité de l'élément C est proposé dans la discussion de ce manuscrit.

Enfin, la création d'un élément artificiel regroupant les différents sites caractérisés (deux sites Hox/Pbx, Meis1, 3 boîtes E, site SP/KLF, del1a.2) et l'analyse du profil transcriptionnel produit par celui-ci permettraient de déterminer s'il est nécessaire d'identifier d'autres blocs conservés pour expliquer le patron d'activité de l'élément C.

1.8.d) Limites du système d'électroporation poulet

L'électroporation du tube neural de poulet est un système qui combine de nombreux avantages. D'une part, il permet de limiter spatio-temporellement la transfection et de ne modifier l'information génétique que des seules cellules du tube

neural à partir des stades de début de segmentation. L'expérimentateur s'affranchit ainsi de nombreux effets délétères ou parasites associés aux perturbations du développement dans les stades précédant la segmentation du rhombencéphale et dans des régions anatomiques différentes. D'autre part, il suit un protocole relativement léger en termes de moyens et de temps, rendu plus rapide encore par l'utilisation d'un rapporteur fluorescent qui permet une observation immédiate des embryons après collecte. En deux jours, plusieurs conditions peuvent être testées.

Néanmoins, ce système expérimental possède plusieurs limites qui obligent à le compléter par d'autres approches pour des études plus approfondies. La première est la variabilité intrinsèque induite par l'électroporation. Elle provient d'une part de la quantité fluctuante d'ADN qui est incorporée par les cellules, soumise à des processus stochastiques et à la modulation locale par l'environnement du champ électrique appliqué aux cellules (inclinaison de l'embryon sur l'œuf, profondeur avec laquelle sont enfoncées les électrodes sur la membrane vitelline...), non contrôlée par l'expérimentateur, et d'autre part de la violence du champ électrique qui peut retarder de quelques heures le développement de l'embryon ou entraîner la mort d'une certaine proportion de ses cellules qui vont alors adopter un comportement transcriptionnel aberrant. De plus, l'ADN transfecté reste sous état épisomal et ne se réplique pas. Il se dilue donc au fur et à mesure des divisions cellulaires et la transfection n'est donc que temporaire. C'est vraisemblablement la raison pour laquelle l'activité de Ccœur n'est que rarement observée dans r5 par électroporation chez le poulet alors que les lignées transgéniques de poisson montrent qu'elle est présente dans ce rhombomère à partir du stade 10-18 ss. La stabilité des protéines rapporteurs, en particulier de la Gfp, explique qu'un signal puisse tout même être observé et interprété 24 h après électroporation alors qu'il est probable que l'ADN épisomal injecté est trop dilué pour être transcrit de façon efficace plus de 8-12 h après transfection. En fait, le temps de repliement de la Gfp nécessaire à sa fluorescence justifie ce temps d'attente de 24 h. En revanche, l'ensemble de ces données entraînent que le signal fluorescent observé 24 h après électroporation ne constitue pas un 'instantané' de l'activité de l'élément C, mais intègre au contraire l'ensemble des événements transcriptionnels s'étant déroulés pendant les premières heures où l'ADN épisomal a été transcrit. Si cette propriété peut être intéressante à exploiter pour l'observation de certains phénotypes, le suivi temporel détaillé d'un profil

d'activité ou l'analyse subtile de la plupart des mutations nécessitera l'établissement de lignées transgéniques ichthyennes ou murines.

II. Analyse transcriptomique du rhombencéphale murin par RNA-Seq

Préambule

Parallèlement aux expériences sur les séquences de l'élément C, un second aspect de mes travaux de thèse s'est appuyé sur l'utilisation de la technologie de RNA-Seq pour mesurer, dans le rhombencéphale murin en début de segmentation, le niveau d'expression de l'ensemble des unités transcriptionnelles du génome. L'objectif était, d'une part, d'accélérer les recherches portant sur les éléments régulateurs de *Krox20* qui suivaient le schéma "1. identification puis caractérisation fonctionnelle d'un bloc conservé – 2. identification du FT interagissant au moyen d'une approche par gènes candidats", en réduisant la recherche de candidats au sous-ensemble des gènes effectivement exprimés dans le rhombencéphale. D'autre part, cette démarche visait également à mettre en lumière *de novo* des facteurs importants pour la segmentation du rhombencéphale en s'appuyant sur leur expression différentielle dans le rhombencéphale précoce, comparée à celle dans la partie antérieure du tube neural. Le transcriptome de la partie antérieure du tube neural a donc également été séquencé par RNA-Seq pour servir de point de référence. L'établissement de ces deux transcriptomes ayant nécessité préalablement la dissection d'un grand nombre d'embryons et la séparation du tube neural et du mésoderme adjacent, le transcriptome du mésoderme a également été séquencé, sur une échelle réduite, afin de mesurer et corriger la contamination en provenance de ce tissu.

Les mesures pour ces trois transcriptomes produisent des résultats fiables et cohérents avec le processus de segmentation du rhombencéphale. De plus, la comparaison entre les transcriptomes du rhombencéphale et de la partie antérieure du tube neural a permis de mettre en évidence plusieurs FTs susceptibles de jouer un rôle dans la segmentation du rhombencéphale et non décrits à ce jour. Les premières études fonctionnelles sur ces facteurs suggèrent que c'est effectivement le cas.

Les répertoires transcriptomiques du rhombencéphale, de la partie antérieure du tube neural et du mésoderme constituent donc des bases de données exhaustives et quantitatives du génome murin, d'une grande précision, et des outils puissants pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans les processus de développement liés à ces régions. Afin de les mettre à disposition de la communauté scientifique, il a été décidé de publier ces bases de données, ainsi que les analyses sur les nouveaux FTs identifiés comme régulateurs potentiels de la segmentation du rhombencéphale, au sein d'un article présenté dans cette partie.

Identification of potential regulators of hindbrain segmentation by transcriptome analysis

Johan Le Men^{1,2,3}, Maria Bernard^{1,2,3}, Stéphane Le Crom^{1,2,3}, Patrick Charnay^{1,2,3} and Pascale Gilardi-Hebenstreit^{1,2,3}*

¹Ecole Normale Supérieure, IBENS, Paris Cedex 75230, France

²Inserm, U1024, Paris Cedex 75230, France

³CNRS, UMR 8197, Paris Cedex 75230, France

Correspondence should be addressed to P.C., Developmental Biology Section, IBENS, 46 rue d'Ulm, Paris Cedex 75230, France; tel: 33 1 44 32 36 07; fax: 33 1 44 32 39 88; mail: charnay@biologie.ens.fr

Running title:

Key words: RNA-Seq, transcription factors, segmentation, rhombomere, mouse

ABSTRACT

During early development the vertebrate hindbrain undergoes a transient segmentation process leading to the formation of metameric units called rhombomeres. Relatively few transcription factors (TF) have been identified as being involved in the control of the early steps of this process. To find new regulators of hindbrain segmentation, we established quantitative transcriptomic databases of the hindbrain, the anterior neural tube and the surrounding mesoderm by microdissection followed by high-throughput RNA sequencing. We show that this approach provides satisfactory measurements of the levels of specific markers for the three tissues. In addition, almost all the known players of early hindbrain segmentation are found among the genes over-represented in the hindbrain. We selected four transcription factor genes belonging to the latter category for further studies. We show that three of them are genetically linked to *Krox20*, a major actor of hindbrain segmentation. These observations functionally validate our database and suggest that it should be helpful to identify novel genes involved in hindbrain, anterior neural and mesoderm development.

INTRODUCTION

The morphogenesis of the vertebrate hindbrain involves a transient segmentation process along the anteroposterior (AP) axis, which leads to the generation of seven to eight transversal units called rhombomeres (r), noted r1 to r8 (Fraser et al., 1990; Lumsden and Krumlauf, 1996). This subdivision presages the metamerism pattern of neuronal specification in the hindbrain (Lumsden and Keynes, 1989; Clarke et al., 1998) and participates in establishing the migration streams of the neural crest into the branchial arches (Lumsden et al., 1991; Serbedzija et al., 1992; Birgbauer et al., 1995; Kulesa and Fraser, 2000; Trainor and Krumlauf, 2000; Trainor et al., 2002), thus playing an essential role in craniofacial morphogenesis. Rhombomeres act as compartments and constitute both units of cell lineage restriction (Fraser et al., 1990; Birgbauer and Fraser, 1994) and domains of specific gene expression (Lumsden and Krumlauf, 1996; Rijli et al., 1998).

Numerous genes have been implicated in various steps of the segmentation process, including segment formation, identity specification and cell lineage restriction. The establishment of cell lineage restriction involves Eph and Ephrin whose alternate domains of expression confer opposite adhesive and repulsive properties to cells from odd- and even-numbered rhombomeres (Guthrie et al., 1993; Becker et al., 1994; Cheng and Flanagan, 1994; Bergemann et al., 1995; Cooke et al., 2001, 2005; Cooke and Moens, 2002). Segment formation and specification are more intricate processes and involve several genes implicated in both aspects (Studer et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999; Voiculescu et al., 2001). Hence, Hox genes from the paralogous groups 1 to 4 specify segmental identities (Bell et al., 1999; Jungbluth et al., 1999; Gavalas et al., 2003; Eddison et al., 2004; Lumsden, 2004; Guthrie, 2007), as exemplified by the transformation of r4 territory into a r2-like rhombomere in an *Hoxb1* mutant (Studer et al., 1996). However, *Hox* PG1 and 2 also participate in segment formation, as shown by the loss of rhombomeric territories in single and compound mutants (Carpenter et al., 1993; Mark et al., 1993; Gavalas et al., 1997; Davenne et al., 1999; Rossel and Capecchi, 1999; Barrow et al., 2000). Other TF involved in the early segmentation process include the Pbx/Meis Hox cofactors (Vlachakis et al., 2001; Choe et al., 2002; Waskiewicz et al., 2002; Deflorian et al., 2004), the Irx factors in the anterior hindbrain (Lecaudey et al., 2004; Matsumoto et al., 2004; Anselme et al., 2007; Stedman et al., 2009), vHnf1 and

MafB in r5 and r6 (McKay et al., 1994; Manzanares et al., 1999; Sun and Hopkins, 2001; Giudicelli et al., 2003; Wiellette and Sive, 2003) and the zinc-finger TF *Krox20*/*Egr2* in r3 and r5 (Wilkinson et al., 1989; Schneider-Maunoury et al., 1993). *Krox20* plays a key role in these rhombomeres by coupling segment delimitation, segment specification and cell lineage restriction (Schneider-Maunoury et al., 1997; Giudicelli et al., 2001; Voiculescu et al., 2001). It exerts its complex function in particular by direct transcriptional activation of *Hoxa2*, *Hoxb2*, *EphA4* and itself in r3 and r5 (Sham et al., 1993; Nonchev et al., 1996a, 1996b; Vesque et al., 1996; Seitanidou et al., 1997; Giudicelli et al., 2001) and *Hoxb3* in r5 (Manzanares et al., 2002), and by repression of *Hoxb1* (Giudicelli et al., 2001; Garcia-Dominguez et al., 2006).

Despite many studies performed on the mechanisms of hindbrain segmentation, a number of actors are still missing to understand the early steps of this process. Hence, taking *Krox20* regulation as an example, all the factors known to be involved in its activation in r5 are also present in r6 (Chomette et al., 2006). Similarly, the TF known to activate *Krox20* in r3 are also found more posteriorly (Wassef et al., 2008; Stedman et al., 2009). In addition, Fibroblast Growth Factor (FGF) signaling has been shown to regulate *Krox20* expression (Marín and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2004; Aragon and Pujades, 2009; Labalette et al., 2011), but its molecular effectors are still unknown.

To identify novel genes potentially involved in hindbrain patterning, we used microdissection combined with whole transcriptome sequencing (RNA-Seq) to establish a quantitative transcriptomic map of the mouse embryo hindbrain at the 1-4 somites stage (ss). We also analyzed the surrounding mesoderm to control for contamination and the anterior neural tube to identify genes specifically expressed in the hindbrain. We show that our measurements faithfully reflect the expression patterns of different regional markers. Furthermore, we find that, among the TF over-expressed at least 2-fold in the hindbrain as compared to the anterior neural tube, half of them have been reported to be associated with brain development. In addition, almost all known players of hindbrain segmentation are found among the genes over-represented in the hindbrain. To further validate our database, we selected four genes within this category and performed expression and functional studies. Three of them appear genetically linked to *Krox20*, establishing the interest of our collections.

MATERIALS AND METHODS

Microdissection assay

Embryos were handled in cold L15 medium (Gibco®). Neural tubes from 125 1-4 ss OF1 mouse embryos were isolated from surrounding mesendoderm by a 10min dispase I treatment (Roche®) at 1mg/mL in L15 medium at room temperature followed by a 5 min inactivation in cold goat serum. Mesendoderm tissues were removed manually and collected together to serve as a control tissue (mes). The rostral part of the remaining neural tube up to the prospective MHB was collected and labeled as anterior neural tube (ant) while the tissues contained between this limit and the first somite was labeled as hindbrain (hind) although it might include the MHB itself and the most posterior part of the midbrain (Supp. Fig. 1A,B). Tissues were conserved into RNA-later (Ambion®) at 4°C during the time needed to complete dissection of around 30 embryos (approximately one week). Total RNA was then extracted using RNAqueous® Kit (Ambion®) and conserved at -80°C up to sequencing. For every pool of 30 dissected embryos, RNA quantity and quality was measured using a Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies®; Supp. Fig. 1C-E). The reliability and the precision of the microdissection were analyzed by RT-qPCR using hindbrain (*Krox20*, *Gbx2*), anterior (*Otx2*) and mesoderm (*Foxc1*) markers (Supp. Fig. 1F-I). For the three dissected tissues, RNA from three of the four pools of 30 dissected embryos was then gathered and sent for sequencing (approximately 10µg of total RNA).

RNA-sequencing

cDNA libraries and sequencing

Strand non-specific cDNA libraries (mRNA-Seq 8-Sample Prep Kit) were prepared according to manufacturer's instructions (Illumina). The validation of libraries was made with Bioanalyzer DNA 1000 chip (Agilent). All libraries were sequenced in single read mode with 75 cycles, using a Genome Analyzer Iix instrument (Illumina).

Reads mapping and expression estimation

Before the mapping, we trim polyN read tails, remove reads with a length lower or equals to 11 bases and discard reads with quality mean lower or equals to 12. We mapped reads using the Eoulsan software solution (Jourden et al, 2012). Precisely, reads were mapped on the *Mus musculus* reference genome (build 37 from ensembl)

with Bowtie (version 0.12.7)(Langmead et al, 2009) using an alignment of 28 bp as a seed, allowing a mismatch quality score up to 70 with up to 2 mismatches located in the seed. Before expression estimation, alignments from reads that matches more than one time on the reference genome are removed using the Java version of samtools (Li et al, 2009). To compute gene expression, we used *Mus musculus* GFF3 genome annotation from Ensembl (version 37.56) and we counted all overlapping regions between alignments and referenced exons. At the end, the output file contains for each annotated gene, the alignment counts and additional information as the number of not covered bases.

Data exploitation

For this study, only the transcript isoform with the highest number of mapped reads was kept for each gene. Alignment counts was computed as RKM units (Reads per Kilobases per ten of Millions of mapped reads) where the number of reads associated with one gene is normalized by the size of the gene covered by reads (in kilobases) and the total amount of mapped sequences used for the experiment (in ten of millions of reads). This amount is 53,514,807 for the anterior neural tube, 50,724,125 for the hindbrain and 21,080,176 for the mesoderm. Biological processes enrichment analysis in genes over-represented in the hindbrain was performed using the Genecodis software (<http://genecodis.cnb.csic.es/>)(Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012).

In-situ hybridization

Whole-mount in situ hybridization was performed as previously described (Giudicelli et al., 2001). The probes for simple in situ hybridization were as follows: a mouse *Krox20* probe (Wilkinson et al., 1989), a mouse *Ppp1r1b* (obtained by PCR amplification of the hindbrain cDNA library using 5'-GCCTGGCACATAAGCTCAGAGCC-3' and 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGTTGGGGACTCAACGCCC-3' primers followed by retrotranscription with the T7 enzyme (Promega®)), a mouse *Olig3* (obtained by PCR amplification of the hindbrain cDNA library using 5'- ACACCACTCGGCCTTCCACTG-3' and 5'- TAATACGACTCACTATAGGGGCGTGGCATGAGGGAAAGAAGCA-3' primers followed by retrotranscription with the T7 enzyme (Promega®)), a mouse *vHnf1* (Ott et

al., 1991), a mouse *Hes3* (Hirata et al., 2001) and a chicken *Krox20* and *Hoxb1* (Giudicelli et al., 2001)

Mouse lines and in ovo electroporation

The *Krox20* mutant mice were obtained from the *Krox20/lacZ* line (Schneider-Maunoury et al., 1993). In ovo electroporation in the chick neural tube was performed as previously described (Giudicelli et al., 2001) at stages HH8-10. The *Olig3*, *Hes3* and *Pou5f1* overexpressing vector were constructed by cloning the complete coding mouse cDNAs together with a HA epitope-coding sequence into the pAdRSVSp plasmid immediately before the stop codon (Giudicelli et al., 2002). The *Hes3* Δ Cter construct was obtained by deleting the four last Cter amino-acids (WRPW) from the *Hes3* sequence. The C-GFP reporter plasmid was constructed by cloning the chicken element C (Labalette et al., 2011) into the BGZ40 plasmid (Yee and Rigby, 1993) upstream of the minimal β -*globin* promoter-*gfp* reporter. The overexpressing vector were electroporated at 0.1 μ g/ μ L and the C-GFP reporter construct at 1 μ g/ μ L. The efficiency of *Olig3*, *Hes3* or *Pou5f1* overexpression was controlled by immunocytochemistry against the HA epitope.

RESULTS

Proof of principle: analysis of regional and germ line markers

Using RNA-Seq, we generated about 110 millions reads of 75 bp-long sequences for poly(A)-selected RNA from anterior neural tube and hindbrain preparations (see Materials and Methods). This amount positions us above most of the studies reporting reliable gene expression measurements in mouse or human systems (Mortazavi et al., 2008; Toung et al., 2011; Beyer et al., 2012; Brunskill and Potter, 2012; Hutchins et al., 2012; Kim et al., 2012; Ku et al., 2012; Song et al., 2012). In the case of the mesoderm, since this tissue was used as a control for contamination, we were only interested in highly expressed genes and the sequencing depth was reduced to 44 millions of mapped reads.

The reliability and the precision of the dissection (see Materials and Methods) and of the RNA-Seq measurement were analyzed using Hox genes and markers of the three dissected regions as references. Transcript levels measured by RNA-Seq are usually represented with RKM units (Reads per Kilobase per Million of mapped reads), where the number of reads associated with one gene is normalized by its size (in kilobases) and the total amount of sequences used for the experiment (in millions of reads). As we are focusing on transcription factors that are generally expressed at relatively low levels, we used the more appropriate RKtM unit (Reads per Kilobase per ten of Millions of mapped reads). Hox transcript levels in the hindbrain (Table 1) are consistent with what is known about their expression dynamics. *Hoxa1* is associated with the highest RKtM value (722), which is coherent with the fact that it is the first Hox gene activated in the hindbrain, with a large expression domain posterior to the r2/r3 boundary (Murphy and Hill, 1991). *Hoxb1* expression (RKtM = 146) begins slightly later and is restricted to r4 at the stage of the study (Frohman et al., 1990). *Hoxa2* (RKtM = 42.5) and *Hoxb2* (RKtM = 149) are expressed in large territories like *Hoxa1* (up to the r1/r2 and r2/r3 boundaries, respectively), but their expression is initiated later, consistent with their weaker RKtM values (Hunt et al., 1991). The low levels of *Hox* PG3 (RKtM around 30) and *Hox* PG4 (RKtM around 5) are explained by their late onset and their caudal restriction (Tümpel et al., 2009).

Very low *Hox* RKtM measurements in the anterior neural tube sample indicated that contamination by hindbrain tissue is limited to less than 5%. This was confirmed by the RKtM values of other hindbrain-specific markers such as *Krox20*, *EphA2* or *Gbx2*

A				B hindbrain markers			
	RKtM ant	RKtM hind	RKtM meso		RKtM ant	RKtM hind	RKtM meso
<i>Hoxa1</i>	3.17	722	157	<i>Egr2</i>	0.62	155	9.75
<i>Hoxb1</i>	0.62	146	185	<i>Gbx2</i>	5.41	433	163
<i>Hoxd1</i>	1.8	6.98	41.7	<i>EphA2</i>	5.48	173	284
<i>Hoxa2</i>	0.31	42.5	44.3	C mid/forebrain markers			
<i>Hoxb2</i>	4.24	149	279		RKtM ant	RKtM hind	RKtM meso
<i>Hoxa3</i>	0	39.7	16.6	<i>Six3</i>	690	27.8	3.63
<i>Hoxb3</i>	1.34	33.5	109	<i>Foxd4</i>	1366	185	52.9
<i>Hoxd3</i>	0.1	18.1	1.88	<i>Otx2</i>	1642	423	127
<i>Hoxa4</i>	0	2.71	2.97	D mesoderm markers			
<i>Hoxb4</i>	0.26	2.48	34.8		RKtM ant	RKtM hind	RKtM meso
<i>Hoxc4</i>	0.11	8.11	0.57	<i>Foxd1</i>	18,6	1,61	159
<i>Hoxd4</i>	0.14	4.76	0.55	<i>Foxc2</i>	2,58	2,47	767
				<i>Meox1</i>	0,25	41,3	838

Table 1. **RNA-Seq measurements of Hox genes and of hindbrain, mid/forebrain and mesoderm markers**

Hox RKtM measurements are coherent with their expression dynamics in the hindbrain (**A**) and indicate that contamination of the anterior sample by hindbrain tissue is limited. This is confirmed by the RKtM values of hindbrain markers (**B**). Note that both Hox genes and the hindbrain markers used in B are reported to be also expressed in the mesoderm. Analysis of mid/forebrain markers (**C**) reveals limited but significant expression in the hindbrain sample, consistently with the microdissection procedure (see Materials and Methods). Expression levels of mesoderm markers (**D**) indicate that contamination from mesoderm is limited.

ant: anterior sample, hind: hindbrain sample, meso: mesoderm sample, RKtM: Reads per Kilobases per ten of Millions of mapped reads.

(Table 1). Analysis of mid/forebrain markers such as *Six3*, *Foxc4* and *Otx2*, which are expressed from the anterior tip of the neural tube to more and more caudal limits, up to the MHB, revealed limited but significant expression in the hindbrain sample (Table 1), consistent with the fact that the dissection was performed anterior to the mid/hindbrain boundary (MHB). Thus our assay should allow us to detect any gene specifically expressed in the hindbrain, even in its most anterior part. Finally, analysis of mesoderm markers such as *Foxd1*, *Foxc2* and *Meox1* revealed limited levels of mesoderm contamination: approximately 10% in the anterior neural tube sample (*Foxd1*) and less than 5% in the hindbrain sample (*Meox1*). The *Meox1* measurement illustrates the interest of measuring mesoderm contamination. As *Meox1* is expressed in the posterior mesenchyme (Welsh and O'Brien, 2000), hindbrain RKtM expression resulting from adjacent mesoderm contamination artifactually appears as enriched compared to the anterior neural tube. For this reason, we discarded genes whose hindbrain RKtM value was less than 10% its mesoderm value in our further analyses.

Most actors of hindbrain segmentation are over-expressed in the hindbrain sample

We then examined genes showing an at least 2-fold increase in the hindbrain as compared to anterior neural tube and whose expression in the hindbrain exceeded 5 RKtM. With these conditions, we found 357 protein-coding genes, representing 1.5% of the total number of protein-coding genes. Strikingly, this group includes most of the known actors of the segmentation process, such as Hox genes, *Krox20*, *Gbx2*, Irx genes, *vHnf1*, *MafB* or *EphA2* (Fig. 1A,B). Transcription factor genes were also notably enriched in this group (Fig. 1D), constituting approximately a quarter of it, as compared to 9-10% in the mouse genome. Other enriched biological functions included cell differentiation and developmental processes. Within the subset of 87 hindbrain-specific transcription factors, half have been reported to be associated with brain development (Fig. 1B) and a large part of the enriched biological functions were related to pattern formation, and neural tube and hindbrain development (Fig. 1E). Together these data support the relevance of our approach to search for new TF involved in hindbrain segmentation. Since most characterized actors of hindbrain development are either strongly over-expressed in the hindbrain (> 20 fold) or moderately over-expressed, but expressed at

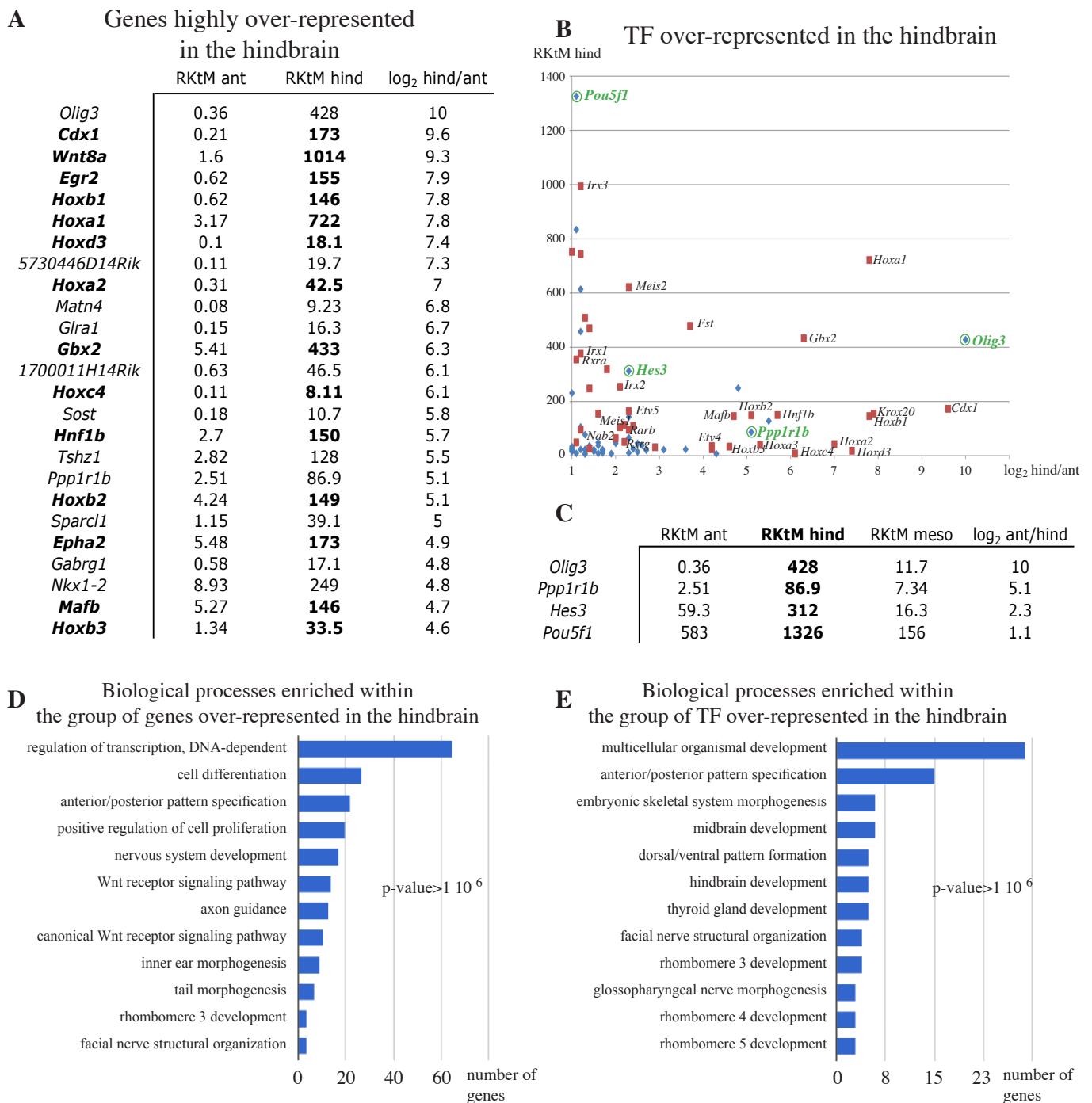


Figure 1. Characterization of the genes over-represented in the hindbrain.

(A) RKtM values and expression fold increase of the 25 most highly over-represented genes in the hindbrain as compared to anterior neural tube. Known actors of hindbrain segmentation are in bold. (B) Scatter graph representing TF over-expressed in the hindbrain (> 2-fold as compared to anterior neural tube) according to their fold increase (abscissa) and their hindbrain RKtM value (ordinate). Red squares correspond to genes involved in brain development and known actors of hindbrain segmentation are named. Genes selected for further investigation are circled in green. (C) RKtM values and expression fold increase of the 4 genes selected for further studies. (D-E) Ontological classification of the genes (D) or TF (E) over-represented in the hindbrain (> 2-fold as compared to anterior neural tube). Graphs represent the number of genes per singular biological process whose enrichment statistical significance (determined by calculating the p-value) exceeds $1 \cdot 10^{-6}$. Only the twelve first biological processes are shown. D and E have been obtained using Genecodis 2.0.

ant: anterior sample, hind: hindbrain sample, log₂ : logarithm (base 2), RKtM: Reads per Kilobases per ten of Millions of mapped reads.

high levels (> 200 RKtM) in the hindbrain (Fig. 1B,C), we used these criteria to select four genes for further studies.

***Ppp1r1b* is a genetic target of *Krox20* in r3**

Ppp1r1b (Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 1b) is an inhibitory regulatory subunit of the Protein Phosphatase 1, a major eukaryotic protein serine/threonine phosphatase. *Ppp1r1b* is not a TF, but was included in our list because it was reported as being involved in DNA-dependent transcription control (Svenningsson et al., 2000). Among a large number of catalytic and regulatory subunits of protein phosphatases, *Ppp1r1b* is the only one to show high level over-expression in the hindbrain, the others being mostly homogeneously expressed in the anterior brain, hindbrain and mesoderm (Supp. Table 1). *Ppp1r1b* expression is initiated at 2 ss in the hindbrain in a small transversal band that prefigures and then corresponds to r3 at 5 ss (Fig. 2A,B). From 7 ss, it progressively disappears from r3 and is no longer detected at 15 ss (Fig. 2C-F). The overlap between *Ppp1r1b* and *Krox20* expression in r3 suggested the existence of a genetic link between these two genes. To investigate this possibility, we investigated *Ppp1r1b* expression in a *Krox20* null background. Indeed, *Ppp1r1b* expression is lost in the mutant (Fig. 2G), indicating that this gene constitutes a genetic target of *Krox20*. This observation is consistent with the slight delay in the appearance of *Ppp1r1b* mRNA (2 ss, Fig. 2A) as compared to *Krox20* mRNA (0 ss, Wilkinson et al., 1989).

Olig3* is expressed in the r3 region, independently of *Krox20

Olig3 is a bHLH transcription factor belonging to the Olig family, whose members are involved in the development of oligodendrocytes and somatic motor neurons (Rowitch et al., 2002; Ligon et al., 2006). It is the most highly over-expressed gene in the hindbrain as compared to anterior neural tube according to our RNA-Seq measurements (Fig. 1A). We examined its expression by in situ hybridization. *Olig3* expression is initiated before 0 ss in a transversal band that becomes reinforced up to the 4 ss (Fig. 3A-E). Double labeling with *Krox20* (Fig 3C) and with *Hnf1b*, which is expressed caudally up to the r4/r5 boundary (Fig. 3D) indicated that the *Olig3*-positive territory encompasses r3 and the anterior part of r4. After 4 ss, *Olig3* mRNA progressively disappears from the r3/r4 region, whereas the gene is transiently expressed in the posterior ectoderm at 7 ss (Fig. 3E). Since the *Olig3* and *Krox20* expression domains

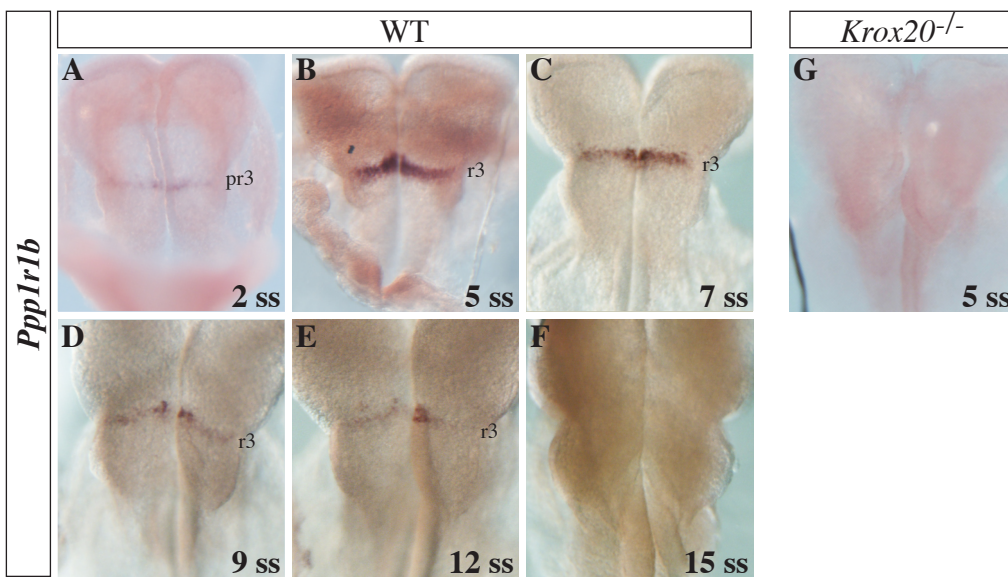


Figure 2. *Ppp1r1b* is under *Krox20* control.

(A-G) In situ hybridization against *Ppp1r1b* in whole-mount embryos at different stages reveals that *Ppp1r1b* is transiently expressed in r3 (A-F). This expression is lost in *Krox20* null mutants (G).

pr : pre-rhombomere, r : rhombomere.

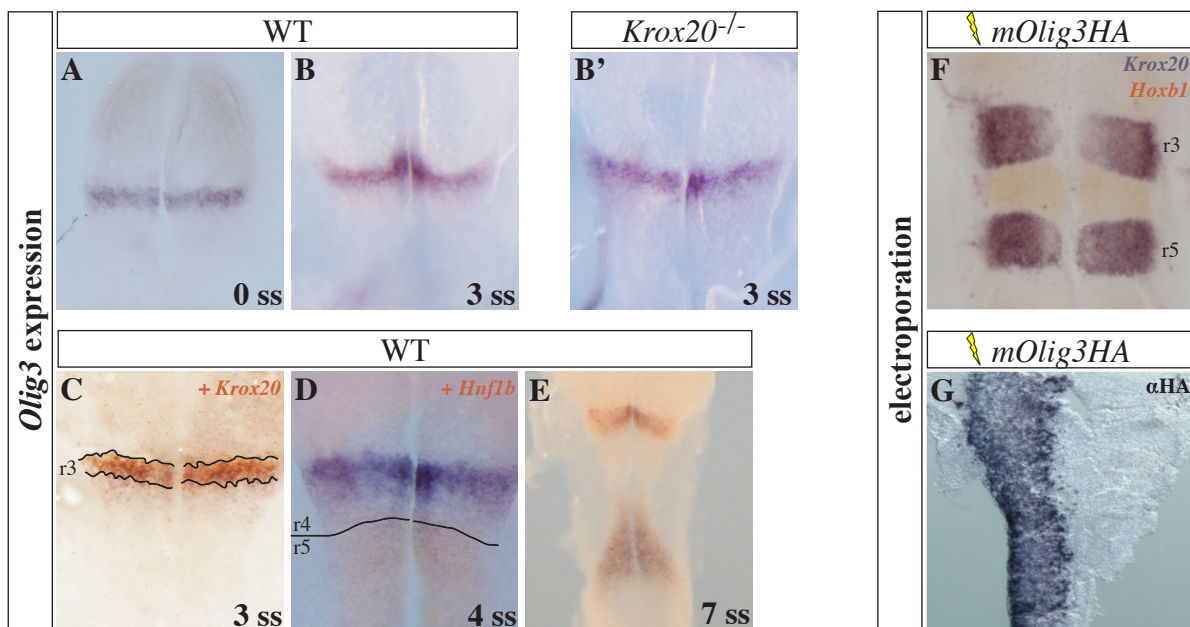


Figure 3. ***Olig3*** is expressed in r3 independently of ***Krox20***.

(A-E) In situ hybridization against *Olig3* (in purple) in WT whole-mount embryos at different stages reveals that *Olig3* is expressed in a transversal band, which is also present in *Krox20* null mutants (B'). Double labeling with *Krox20* (in orange, C) or with *Hnf1b* (in orange, D) indicates that *Olig3* expression domain encompasses r3 and the anterior part of r4. The borders of *Krox20* expression domain in r3 and the anterior limit of *Hnf1b* territory are outlined. (F,G) *Olig3* over-expression in the chick neural tube by electroporation of a HA-tagged mouse *Olig3* expression vector did not lead to any modification of *Krox20* (F, in purple) or *Hoxb1* (F, in orange) expression domains, revealed by in situ hybridization. An anti-HA immunolabeling (G) shows that the OLIG3 protein is present in the whole neural tube on the electroporated side. Embryos in F and G are flat-mounted and electroporated side is on the left.
r : rhombomere.

overlap in r3, we investigated the existence of a possible genetic link between these two genes. Inactivation of *Krox20* in the mouse embryo did not affect *Olig3* expression (Fig. 3B'), indicating that *Krox20* is not required for *Olig3* activation in r3. We then performed *Olig3* gain-of-function experiments by electroporation of an *Olig3* expression construct in the chick neural tube. This did not lead to any modification in the pattern of *Krox20* expression (Fig. 3F,G), suggesting that *Olig3* does not regulate *Krox20* either. This latter conclusion was reinforced by loss-of-function experiments performed in the zebrafish embryo, where double morpholino knock-down of *Olig3* and its close homolog *Olig4* did not affect *Krox20* expression (data not shown). Together, our data identify *Olig3* as the only known marker of the r3 region that is independent of *Krox20*.

***Hes3* can repress *Krox20* transcription**

Hes3 is another bHLH transcription factor that belongs to the vertebrate transcription repressor family homologous to *Drosophila Hairy* and *Enhancer of Split* (Sasai et al., 1992). It has been shown to be involved in various aspects of neural development (Kageyama et al., 2008). *Hes3* is expressed at a high level in the hindbrain, 5-fold higher than in the anterior neural tube (Fig. 1B,C). As *Olig3*, its expression is very dynamic. At 2 ss, *Hes3* is expressed in the caudal part of the embryo, posteriorly to the hindbrain and, at a lower level, in a more anterior area extending from prospective r3 to the midbrain (Fig. 4A). At 5 ss, *Hes3* is expressed at high level in the dorsal part of the neural tube in a region including the isthmus and r1, and at lower levels in r4 and posteriorly to the r5/r6 boundary (Fig. 4B). This pattern does not overlap with that of *Krox20* in the hindbrain, leading us to investigate whether *Hes3* might negatively regulate *Krox20*. For this purpose, we performed electroporation experiments in the chick neural tube with a *Hes3* expression vector. With the wild type *Hes3* protein, we observed a reduction in *Krox20* expression in r5 and to a smaller extent in r3 (Fig. 4C). As *Hes* factors have been shown to mediate repression either actively by recruiting co-repressors (Fisher et al., 1996; Grbavec and Stifani, 1996) or passively by forming inactive heterodimers with other bHLH factors (Sasai et al., 1992), we generated a mutant version of *Hes3* in which the C-terminal part of the protein involved in active repression has been removed. This truncated protein did not affect *Krox20* expression (Fig. 4D), indicating that *Krox20* repression requires the repressor domain. Finally, we investigated whether this repression constitutes a direct transcriptional effect and is mediated by known *cis-*

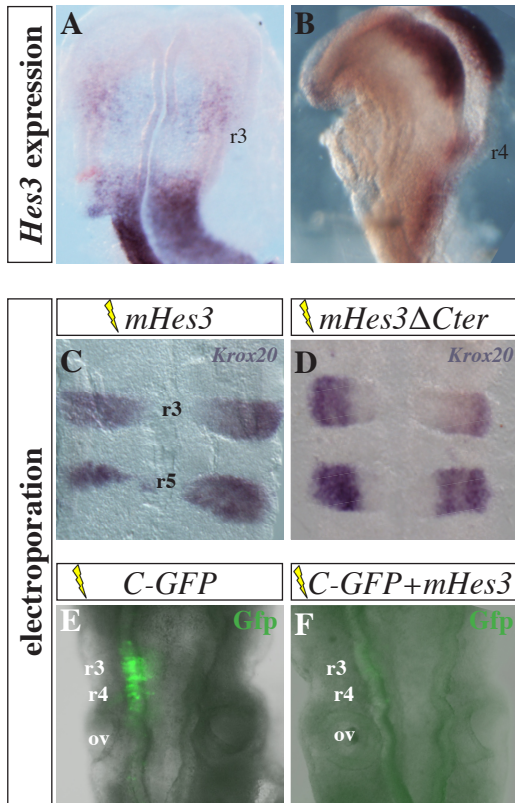


Figure 4. **Hes3** can repress *Krox20* via element C.

(A-B) In situ hybridization against *Hes3* in whole-mount WT embryo at indicated stages. (A) is a dorsal view while (B) is a lateral view showing the dorsal expression of *Hes3* at 5 ss. (C-D) In situ hybridization against *Krox20* in a flat-mounted chick embryos after electroporation with a mouse *Hes3* expressing vector (C) shows a reduction of *Krox20* expression domain in r5 and to a smaller extent in r3. This reduction is not observed when the C-terminal domain of the protein involved in active repression is removed (D). Electroporated side is on the left. (E-F) Whole-mount chick embryos electroporated with a construct carrying the chicken *Krox20* enhancer C driving the GFP reporter alone (E) or with the mouse *Hes3* expressing vector (F). GFP fluorescence is directly observed by fluorescence microscopy. Electroporated side is on the left.
r : rhombomere, ov : otic vesicle.

acting elements. *Krox20* transcription in r3 and r5 involves a cis-acting element called C (Chomette et al., 2006). Element C carries several bHLH binding sites (data not shown), and we tested the effect of *Hes3* expression on its activity by co-electroporation in the chick neural tube of the *Hes3* expression vector with a construct in which a GFP reporter is driven by element C (Labalette et al., 2011). Element C activity was completely abolished by *Hes3* (Fig. 4E,F). Together, our data indicate that *Hes3* can act as a repressor of *Krox20* transcription and that this effect is mediated by element C.

***Pou5f1* activates *Krox20* transcription via element C**

Pou5f1, also known as *Oct4*, is a POU factor that has been shown to control pluripotency in the mouse inner cell mass (Nichols et al., 1998) and in mouse and human embryonic stem cells (Boiani and Schöler, 2005). In the zebrafish, mutation of its ortholog *Pou5f1/Pou2* (*spg* mutation) has been associated with hindbrain segmentation defects and a reduction of *Krox20* expression in r3 (Burgess et al., 2002; Hauptmann et al., 2002). Our RNA-Seq measurements show that *Pou5f1* is highly expressed both in the hindbrain and in the anterior neural tube, with nevertheless a two-fold increase in the hindbrain (Fig. 1B,C), consistent with an analysis of its expression profile (Downs, 2008). Since *Pou5f1* appears involved in the regulation of *Krox20* in r3, we investigated whether it might regulate its transcription via element C. For this purpose we co-electroporated a *Pou5f1* expression vector with the reporter expressing GFP under the control of element C. Over-expression of *Pou5f1* led to extended ectopic expression of the reporter (Fig. 5A,B). This suggests that *Pou5f1* positively regulates *Krox20* at the transcriptional level and that this regulation is mediated by element C.

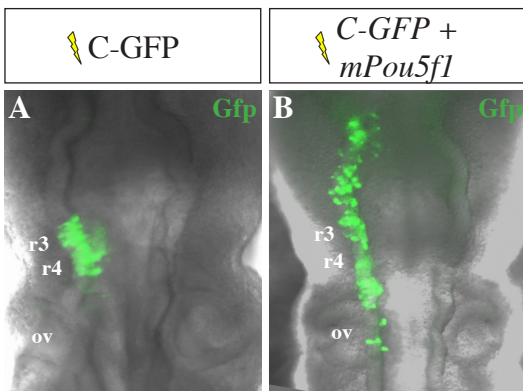


Figure 5. **Pou5f1** activates *Krox20* via element C.

Whole-mount chick embryos electroporated with a construct carrying the chicken *Krox20* enhancer C driving the GFP reporter alone (**A**) or with a mouse *Pou5f1* overexpressing vector (**B**). GFP fluorescence is directly observed by fluorescence microscopy. Electroporated side is on the left.

r : rhombomere, ov : otic vesicle

DISCUSSION

A transcriptome database for hindbrain, anterior neural tube and mesoderm

In this study, we combined microdissection with the use of the RNA-Seq to establish exhaustive and quantitative transcriptomic maps of the early hindbrain, anterior neural tube and surrounding mesoderm. Our analysis is coherent with the data previously obtained on several specific markers, validating our experimental approach.

Attempts to decipher the hindbrain transcriptome have already been performed, but either at later developmental stages or with more limited output due to technical constraints (Christiansen et al., 2001; Chambers and Mason, 2006). Thanks to the sensitivity and precision of RNA-Seq (Marioni et al., 2008; Mortazavi et al., 2008; Sultan et al., 2008; Fu et al., 2009; Agarwal et al., 2010; Bradford et al., 2010), we are able to provide a reliable measurement of the representation of each transcription unit in different regions of the mouse embryo. In particular, we show that half of the TF over-represented in the hindbrain are known to be associated with brain development and that most of known actors of hindbrain segmentation are present in this category. We selected four other genes over-represented in the hindbrain for further study and showed that each of them either constitutes a useful marker or is likely to play a role in hindbrain segmentation. Strikingly, three of them either regulate the *Krox20* gene or are regulated by its product. These latter observations establish the functional interest of our database.

Novel potential regulators of hindbrain segmentation

We have demonstrated that *Ppp1r1b* is a target of *Krox20*. Its activation closely follows *Krox20* initiation in r3, raising the possibility that the regulatory link might be direct. *Ppp1r1b* is the first characterized target of *Krox20* to be activated only in r3 and not in r5. Interestingly, a recent study in the zebrafish has identified another member of the family, *Ppp1r14a*, as a target of *Hoxb1* in r4, essential to the establishment of the r4 FGF signaling center (Choe et al., 2011). According to our RNA-Seq measurements (Supp. Table 1), *Ppp1r14a* is not enriched in the hindbrain. As *Ppp1r14a* in r4, *Ppp1r1b* could be involved in the control of FGF signaling in r3 as it has been reported recently to modulate MAPK/ERK activation in thyroid cells (Chocarro-Calvo et al., 2012).

We report a dynamic expression pattern of *Olig3*. During the early phase of expression, restricted to prospective r3 and part of r4, *Olig3* appears as one of the first genes AP regionalized in the developing hindbrain, suggesting a possible role in the segmentation process. Interestingly, our analysis suggests that its expression is independent from *Krox20*.

We have shown that *Hes3* can repress *Krox20* transcription, and that this repression is likely to involve the cis-acting element C. This potential implication in *Krox20* regulation is consistent with the fact that *Hes1-Hes3* double mutant mice show midbrain and anterior hindbrain defects (Hirata et al., 2001).

Finally, we have shown that, consistently with the reduction of *Krox20* expression in the fish *Pou5f1/Pou2* mutant, over-expression of *Pou5f1* leads to the activation of element C, suggesting a direct involvement in the activation of *Krox20*. As, *Pou5f1* has been shown in the zebrafish to mediate regional competence to respond to FGF signaling in the hindbrain primordium (Reim and Brand, 2002), this raises the possibility that that *Pou5f1* is involved in FGF-mediated regulation of *Krox20* in r3 and r5 (Marín and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2004; Aragon and Pujades, 2009; Labalette et al., 2011).

***Hoxd1* expression in the hindbrain**

In *Xenopus* *Hoxd1* is transiently expressed in a territory similar to that of *Hoxa1* (McNulty et al., 2005). Triple *Hoxa1-Hoxb1-Hoxd1* knockdown leads to complete loss of segmentation in the hindbrain, whereas any double knock-down results in only partial phenotypes (McNulty et al., 2005). This suggests a role for *Hoxd1* in hindbrain segmentation. However, in the mouse, *Hoxd1* expression has not been previously detected in the hindbrain and its involvement in hindbrain segmentation has therefore not been seriously considered in this species (Alexander et al., 2009). We have observed a RKtM value of 6.98 for *Hoxd1* in the hindbrain (Table 1). This level is a very low, but is likely to be significant. Indeed, Hox genes from the paralog groups 5-13, which are not expressed in the hindbrain, all show RKtM values below 1, with the exception of *Hoxa5* (2.61). Although very low, this expression of *Hoxd1* in the hindbrain raises the issue of its possible function in the mouse, like in *Xenopus*. Such a low level of expression is unlikely to be functional, but it will be interesting to investigate whether *Hoxd1* is up-regulated in case of loss-of-function of *Hoxa1* and *Hoxb1*.

Additional potential applications of the database

In this study we have focused on transcription factors genes expressed in the hindbrain. However our database should be useful to study other types of genes or another tissue. For instance, a rapid survey of genes over-represented in the anterior neural tube as compared to the hindbrain allowed us to identify many genes described as involved in various aspects of anterior brain development, such as eye development. Similarly, some of the genes over-represented in the mesoderm are associated with the fate of derivatives of this germ line, such as cardiac or lung development, or angiogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Fanny Couplier, Yassine Bouchoucha and Piotr Topilko for their help and advices in the initial setting up of the microdissection. We would like to thank also Odile Sismeiro and Jean-Yves Coppée for their support and discussion about RNA-Seq technical issues.

REFERENCES

- Agarwal, A., Koppstein, D., Rozowsky, J., Sboner, A., Habegger, L., Hillier, L. W., Sasidharan, R., Reinke, V., Waterston, R. H., and Gerstein, M. (2010). Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC genomics*, **11**, 383.
- Alexander, T., Nolte, C., and Krumlauf, Robb (2009). Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annual review of cell and developmental biology*, **25**, 431–56.
- Anselme, I., Laclef, C., Lanaud, M., Rüther, U., and Schneider-Maunoury, Sylvie (2007). Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fused toes. *Developmental biology*, **304**, 208–20.
- Aragon, F. and Pujades, Cristina (2009). FGF signaling controls caudal hindbrain specification through Ras-ERK1/2 pathway. *BMC developmental biology*, **9**, 61.
- 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 (Cambridge, England)*, **127**, 933–44.
- Becker, N., Seitanidou, T., Murphy, P., Mattéi, M. G., Topilko, P., Nieto, M. A., Wilkinson, D. G., Charnay, P., and Gilardi-Hebenstreit, P (1994). Several receptor tyrosine kinase genes of the Eph family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mechanisms of development*, **47**, 3–17.
- Bell, E., Wingate, R. J., and Lumsden, A (1999). Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science (New York, N.Y.)*, **284**, 2168–71.
- Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R., and Flanagan, J. G. (1995). ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Molecular and cellular biology*, **15**, 4921–9.
- Beyer, M., Mallmann, M. R., Xue, J., Staratschek-Jox, A., Vorholt, D., Krebs, W., Sommer, D., Sander, J., Mertens, C., Nino-Castro, A., et al. (2012). High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PloS one*, **7**, e45466.
- Birgbauer, E. and Fraser, S. E. (1994). Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **120**, 1347–56.
- Birgbauer, E., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. (1995). Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development (Cambridge, England)*, **121**, 935–45.
- Boiani, M. and Schöler, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**, 872–84.
- Bradford, J. R., Hey, Y., Yates, T., Li, Yaoyong, Pepper, S. D., and Miller, C. J. (2010). A comparison of massively parallel nucleotide sequencing with oligonucleotide microarrays for global transcription profiling. *BMC genomics*, **11**, 282.
- Brunskill, E. W. and Potter, S. S. (2012). RNA-Seq defines novel genes, RNA processing patterns and enhancer maps for the early stages of nephrogenesis: Hox supergenes. *Developmental biology*, **368**, 4–17.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, Wenbiao, Hopkins, Nancy, and Brand, M. (2002). The zebrafish spiel-ohne-grenzen (spg) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 905–16.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, Jose M, and Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology*, **8**, R3.
- 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 (Cambridge, England)*, **118**, 1063–75.
- Chambers, D. and Mason, I. (2006). A high throughput messenger RNA differential display screen identifies discrete domains of gene expression and novel patterning processes along the developing neural tube. *BMC developmental biology*, **6**, 9.
- Cheng, H. J. and Flanagan, J. G. (1994). Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, **79**, 157–68.
- Chocarro-Calvo, A., Zaballos, M. A., Santisteban, P., and García-Jiménez, C. (2012). DARPP-32 is required for MAPK/ERK signaling in thyroid cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **26**, 471–80.
- Choe, S.-K., Vlachakis, Nikolaos, and Sagerström, Charles G (2002). Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 585–95.
- Choe, S.-K., Zhang, X., Hirsch, N., Straubhaar, J., and Sagerström, Charles G (2011). A screen for hoxb1-regulated genes identifies ppp1r14al as a regulator of the rhombomere 4 Fgf-signaling center. *Developmental biology*, **358**, 356–67.
- Chomette, D., Frain, Monique, Cereghini, Silvia, Charnay, Patrick, and Ghislain, Julien (2006). Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 1253–62.
- Christiansen, J. H., Coles, E. G., Robinson, V., Pasini, A., and Wilkinson, D. G. (2001). Screening from a subtracted embryonic chick hindbrain cDNA library: identification of genes expressed during hindbrain, midbrain and cranial neural crest development. *Mechanisms of development*, **102**, 119–33.

- Clarke, J. D., Erskine, L., and Lumsden, A** (1998). Differential progenitor dispersal and the spatial origin of early neurons can explain the predominance of single-phenotype clones in the chick hindbrain. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **212**, 14–26.
- Cooke, J. E., Kemp, H. A., and Moens, C. B.** (2005). EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Current biology : CB*, **15**, 536–42.
- Cooke, J. E. and Moens, C. B.** (2002). Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple... *Trends in neurosciences*, **25**, 260–7.
- Cooke, J., Moens, C., Roth, L., Durbin, L., Shiomi, K., Brennan, C., Kimmel, C., Wilson, S., and Holder, N.** (2001). Eph signalling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 571–80.
- 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.
- Deflorian, G., Tiso, N., Ferretti, E., Meyer, D., Blasi, F., Bortolussi, M., and Argenton, F.** (2004). Prep1.1 has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 613–27.
- Downs, K. M.** (2008). Systematic localization of Oct-3/4 to the gastrulating mouse conceptus suggests manifold roles in mammalian development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **237**, 464–75.
- Eddison, M., Toole, L., Bell, Esther, and Wingate, R. J. T.** (2004). Segmental identity and cerebellar granule cell induction in rhombomere 1. *BMC biology*, **2**, 14.
- Fisher, a L., Ohsako, S., and Caudy, M.** (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Molecular and cellular biology*, **16**, 2670–7.
- Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A** (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*, **344**, 431–5.
- Frohman, M. A., Boyle, M., and Martin, G. R.** (1990). Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, **110**, 589–607.
- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Chen, Wei, Li, Yixue, Zeng, R., et al.** (2009). Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC genomics*, **10**, 161.
- Garcia-Dominguez, M., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Charnay, Patrick** (2006). PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *The EMBO journal*, **25**, 2432–42.
- 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 (Cambridge, England)*, **124**, 3693–702.
- Gavalas, Anthony, Ruhrberg, C., Livet, J., Henderson, C. E., and Krumlauf, Robb** (2003). Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 5663–79.
- Ghislain, J.** (2003). Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development*, **130**, 941–953.
- Giudicelli, F, Taillebourg, E., Charnay, P, and Gilardi-Hebenstreit, P** (2001). Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes & development*, **15**, 567–80.
- Giudicelli, François, Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Mechta-Grigoriou, F., Poquet, C., and Charnay, Patrick** (2003). Novel activities of Mafk underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Developmental biology*, **253**, 150–62.
- Grbavec, D. and Stifani, S.** (1996). Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif. *Biochemical and biophysical research communications*, **223**, 701–5.
- Guthrie, S, Prince, V, and Lumsden, A** (1993). Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development (Cambridge, England)*, **118**, 527–38.
- Guthrie, Sarah** (2007). Patterning and axon guidance of cranial motor neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, 859–71.
- Hauptmann, G., Belting, H.-G., Wolke, U., Lunde, K., Söll, I., Abdelilah-Seyfried, S., Prince, Victoria, and Driever, W.** (2002). Spiel Ohne Grenzen/Pou2 Is Required for Zebrafish Hindbrain Segmentation. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 1645–55.
- Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y., and Kageyama, R** (2001). Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *The EMBO journal*, **20**, 4454–66.
- Hunt, P., Whiting, J., Nonchev, S., Sham, M. H., Marshall, H, Graham, A., Cook, M., Allemann, R., Rigby, P. W., and Gulisano, M.** (1991). The branchial Hox code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution. *Development (Cambridge, England)*, **Suppl 2**, 63–77.
- Hutchins, A. P., Poulain, S., Fujii, H., and Miranda-Saavedra, D.** (2012). Discovery and characterization of new transcripts from RNA-seq data in mouse CD4(+) T cells. *Genomics*.
- Jungbluth, S., Bell, E, and Lumsden, A** (1999). Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 2751–8.
- Kageyama, Ryoichiro, Ohtsuka, T., and Kobayashi, T.** (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Development, growth & differentiation*, **50 Suppl 1**, S97–103.

- Kim, K. H., Moon, M., Yu, S.-B., Mook-Jung, I., and Kim, J.-I.** (2012). RNA-Seq analysis of frontal cortex and cerebellum from 5XFAD mice at early stage of disease pathology. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **29**, 793–808.
- Ku, G. M., Kim, H., Vaughn, I. W., Hangauer, M. J., Myung Oh, C., German, M. S., and McManus, M. T.** (2012). Research Resource: RNA-Seq Reveals Unique Features of the Pancreatic β -Cell Transcriptome. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **26**, 1783–92.
- Kulesa, P. M. and Fraser, S. E.** (2000). In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 1161–72.
- Labalette, C., Bouchoucha, Y. X., Wassef, M. A., Gongal, P. A., Le Men, J., Becker, T., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Charnay, Patrick** (2011). Hindbrain patterning requires fine-tuning of early *krox20* transcription by *Sprouty 4*. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 317–26.
- Lecaudey, V., Anselme, I., Rosa, F., and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2004). The zebrafish *Iroquois* gene *iro7* positions the *r4/r5* boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 3121–31.
- Ligon, K. L., Fancy, S. P. J., Franklin, R. J. M., and Rowitch, D. H.** (2006). Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*, **54**, 1–10.
- Lumsden, A and Keynes, R.** (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, **337**, 424–8.
- Lumsden, A and Krumlauf, R** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science (New York, N.Y.)*, **274**, 1109–15.
- Lumsden, A, Sprawson, N., and Graham, A.** (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development (Cambridge, England)*, **113**, 1281–91.
- Lumsden, Andrew** (2004). Segmentation and compartmentation in the early avian hindbrain. *Mechanisms of development*, **121**, 1081–8.
- 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.** (1999). The role of *kreisler* in segmentation during hindbrain development. *Developmental biology*, **211**, 220–37.
- Manzanares, Miguel, Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Marshall, Heather, Giudicelli, François, Martínez-Pastor, M. T., Krumlauf, Robb, and Charnay, Patrick** (2002). *Krox20* and *kreisler* cooperate in the transcriptional control of segmental expression of *Hoxb3* in the developing hindbrain. *The EMBO journal*, **21**, 365–76.
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., and Gilad, Y.** (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research*, **18**, 1509–17.
- 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 (Cambridge, England)*, **119**, 319–38.
- Marín, F. and Charnay, P** (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate *Krox20* and *mafB/kr* expression in the otic/preotic region. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 4925–35.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraiishi, T., Otoguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, Andrew, and Ogura, T.** (2004). The prepattern transcription factor *Irx2*, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nature neuroscience*, **7**, 605–12.
- Maves, L., Jackman, W., and Kimmel, C. B.** (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 3825–37.
- 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 (Cambridge, England)*, **120**, 2199–211.
- McNulty, C. L., Peres, J. N., Bardine, N., van den Akker, W. M. R., and Durston, A. J.** (2005). Knockdown of the complete *Hox* paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 2861–71.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., Mccue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **5**, 1–8.
- Murphy, P. and Hill, R. E.** (1991). Expression of the mouse labial-like homeobox-containing genes, *Hox 2.9* and *Hox 1.6*, during segmentation of the hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **111**, 61–74.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *Oct4*. *Cell*, **95**, 379–91.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, Jose María, and Pascual-Montano, A.** (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research*, **37**, W317–22.
- Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M, Maruthainar, K., Kuroiwa, a, Brenner, S., Charnay, P, et al.** (1996). The conserved role of *Krox-20* in directing *Hox* gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **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** (1996). Segmental expression of *Hoxa-2* in the hindbrain is directly regulated by *Krox-20*. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 543–54.

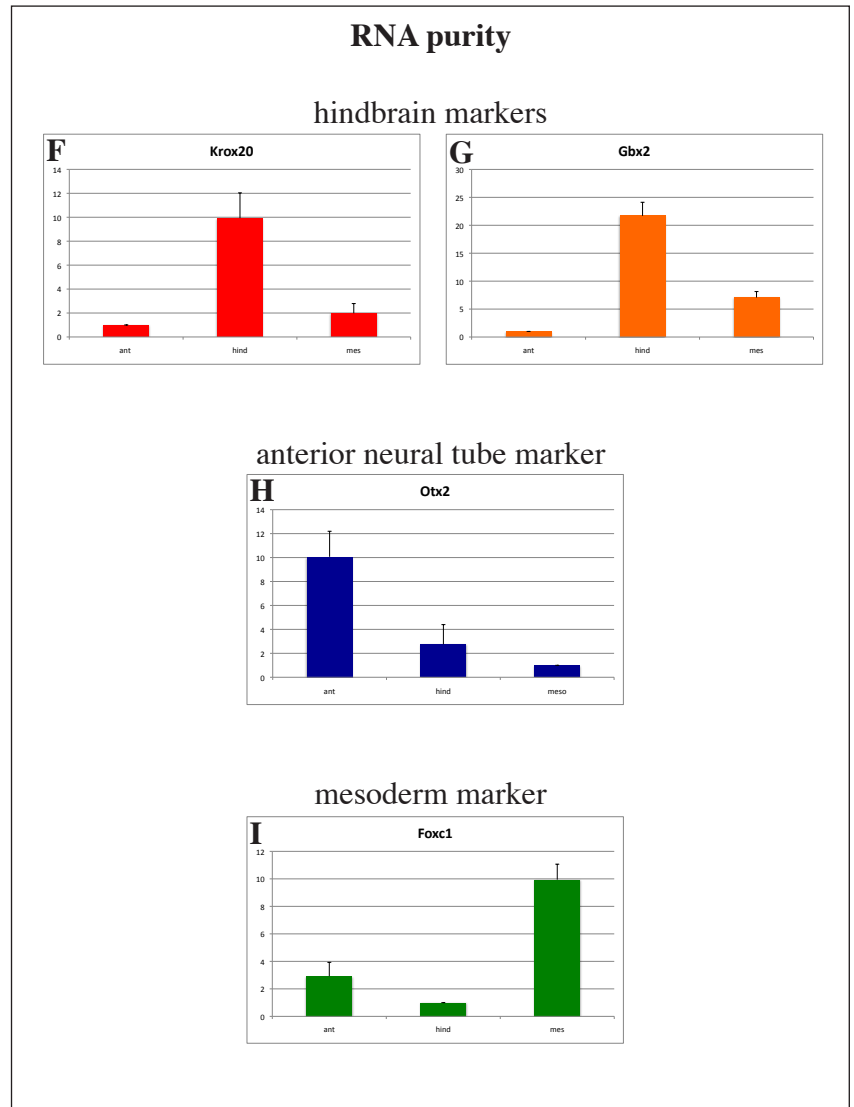
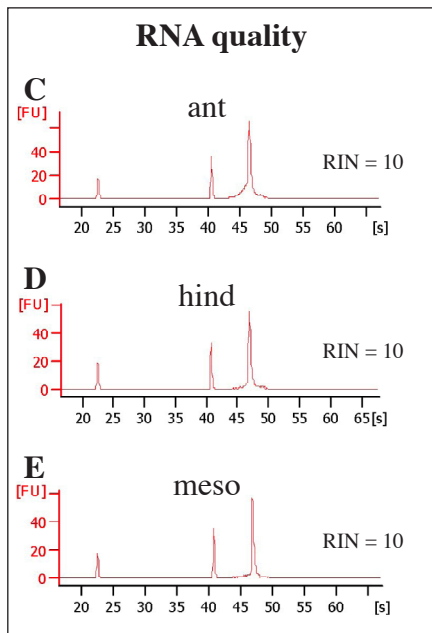
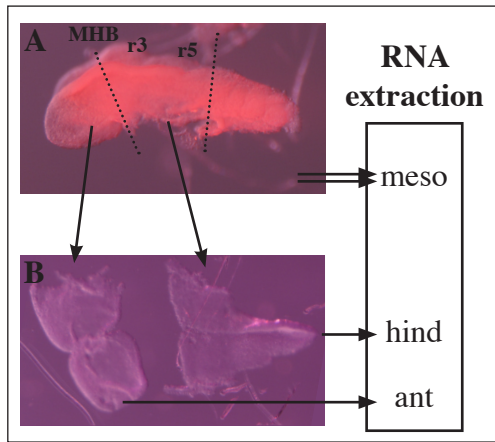
- Ott, M. O., Rey-Campos, J., Cereghini, S., and Yaniv, M.** (1991). vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mechanisms of development*, **36**, 47–58.
- Reim, G. and Brand, M.** (2002). Spiel-ohne-grenzen/pou2 mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 917–33.
- Rijli, F. M., Gavalas, A., and Chambon, P.** (1998). Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes. *The International journal of developmental biology*, **42**, 393–401.
- 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 (Cambridge, England)*, **126**, 5027–40.
- Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessaris, N., and Richardson, W. D.** (2002). An “oligarchy” rules neural development. *Trends in neurosciences*, **25**, 417–22.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S.** (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes & development*, **6**, 2620–34.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P., and Lumsden, A.** (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 1215–26.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P.** (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell*, **75**, 1199–214.
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D. G., and Charnay, P.** (1997). Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mechanisms of development*, **65**, 31–42.
- Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E.** (1992). Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, **116**, 297–307.
- 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.
- Song, H. K., Hong, S.-E., Kim, T., and Kim, D. H.** (2012). Deep RNA sequencing reveals novel cardiac transcriptomic signatures for physiological and pathological hypertrophy. *PLoS one*, **7**, e35552.
- Stedman, A., Lecaudey, V., Havis, E., Anselme, I., Wassef, M., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2009). A functional interaction between Irx and Meis patterns the anterior hindbrain and activates krox20 expression in rhombomere 3. *Developmental biology*, **327**, 566–77.
- 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 (Cambridge, England)*, **125**, 1025–36.
- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R.** Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature*, **384**, 630–4.
- Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., et al.** (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, **321**, 956–60.
- Sun, Z. and Hopkins, N.** (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes & development*, **15**, 3217–29.
- Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Allen, P. B., Moine, C. L., Lindskog, M., Fisone, G., Greengard, P., and Fredholm, B. B.** (2000). Dopamine D(1) receptor-induced gene transcription is modulated by DARPP-32. *Journal of neurochemistry*, **75**, 248–57.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A.** (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*, **40**, W478–83.
- Toung, J. M., Morley, M., Li, M., and Cheung, V. G.** (2011). RNA-sequence analysis of human B-cells. *Genome research*, **21**, 991–8.
- Trainor, P. A. and Krumlauf, R.** (2000). Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, **1**, 116–24.
- Trainor, Paul A, Sobieszczuk, D., Wilkinson, David, and Krumlauf, Robb** (2002). Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 433–42.
- Tümpel, S., Wiedemann, L. M., and Krumlauf, Robb** (2009). Hox genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Current topics in developmental biology*, **88**, 103–37.
- 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. *The EMBO journal*, **15**, 5383–96.
- Vlachakis, N., Choe, S. K., and Sagerström, C G.** (2001). Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 1299–312.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C, Kress, C., Buart, S., Charnay, P., and Schneider-Maunoury, S.** (2001). Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 4967–78.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I. M., Dickson, C., and Mason, I.** (2002). Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Current biology : CB*, **12**, 1117–23.

- Waskiewicz, A. J., Rikhof, H. A., and Moens, C. B.** (2002). Eliminating Zebrafish Pbx Proteins Reveals a Hindbrain Ground State. *Developmental Cell*, **3**, 723–733.
- Wassef, M. a, Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Schneider-Maunoury, Sylvie, Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Charnay, Patrick, and Ghislain, Julien** (2008). Rostral hindbrain patterning involves the direct activation of a Krox20 transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis factors. *Development (Cambridge, England)*, **135**, 3369–78.
- Welsh, I. C. and O'Brien, T. P.** (2000). Loss of late primitive streak mesoderm and interruption of left-right morphogenesis in the Ednrb(s-1Acr) mutant mouse. *Developmental biology*, **225**, 151–68.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2004). Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **229**, 393–9.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2003). vhnf1 and Fgf signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 3821–9.
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P** (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature*, **337**, 461–4.
- Yee, S. P. and Rigby, P. W.** (1993). The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes & development*, **7**, 1277–89.

SUPPLEMENTARY TABLE LEGEND

Supplementary Table 1. RNA-Seq measurements of all protein-coding genes and lincRNA in the anterior neural tube, hindbrain and mesoderm.

ant: anterior sample, hind: hindbrain sample, meso: mesoderm sample, RKtM: Reads per Kilobases per ten of Millions of mapped reads.



Supplementary Figure 1. Microdissection procedure.

Around 125 1-4 ss mouse embryos were dissected as described in Materials and Methods. Mesoderm was removed and collected and the neural tube was cut at two positions shown in (A) in order to separate the anterior part of the neural tube and the hindbrain from the rest of the embryo (B). RNA was then extracted and its quality was assessed using a Bioanalyzer 2100 system (C-E). The pureness of each RNA extract was measured by RT-qPCR using hindbrain (F,G), anterior (H) and mesoderm (I) markers. Each graph shows the relative value of markers expression level in different tissues.

ant : anterior neural tube, hind : hindbrain, meso : mesoderm, MHB : midbrain-hindbrain boundary, RIN : RNA INtegrity score, FU : Fluorescence Unit.

III. L'action morphogénétique des FGFs sur r3 repose sur l'activité en gradient de l'élément C

Le rôle des FGFs dans le développement précoce du système nerveux a été présenté en introduction. Il repose sur l'établissement de centres organisateurs tels que l'ANR, la ZLI ou la MHB. Plus récemment, plusieurs études ont montré l'implication des FGFs issus de r4 dans la segmentation du rhombencéphale (Marín and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2004; Labalette et al., 2011), à travers la modulation des territoires d'expression de *Krox20* dans r3 et r5 et de *MafB* dans r5-r6. Nous avons précédemment montré au laboratoire que pour *Krox20* cette modulation faisait intervenir les deux éléments régulateurs B et C, responsables du démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 et r5 (Labalette et al., 2011). Dans r5, cette action est vraisemblablement relayée, au moins en partie, par la fixation du facteur MafB sur l'élément B (Labalette et al., 2011). Le mode d'action et les acteurs moléculaires impliqués dans la régulation de l'élément C par les FGFs dans r3 ne sont pas connus et sont l'objet de l'article en préparation présenté dans cette partie.

Celui-ci présente un mécanisme original d'action des FGFs sur la régulation du territoire d'expression de *krox20* dans r3 et le positionnement de ses frontières, qui ne suivent pas le modèle classique pour un morphogène diffusant depuis r4 (figure 48.A). En effet, la modulation de la signalisation FGF n'affecte pas la position de la frontière r2/r3 tandis que r3/r4 est déplacée dans une direction opposée à ce qui serait attendu si l'action des FGFs était directe (figure 48.B,C).

Nos résultats montrent que parmi les différentes cascades de signalisation susceptibles de transduire le signal FGF, la voie Ras/Erk est spécifiquement impliquée dans la régulation de la segmentation du rhombencéphale, et fait intervenir les effecteurs transcriptionnels *erm* et *pea3*. Toutefois, les domaines d'expression de ces différents acteurs et du facteur Erk s'étendent de façon uniforme au delà de r3, même dans des conditions de blocage de la signalisation FGF, suggérant que ceux-ci ne portent pas l'information positionnelle pour les frontières de r3. En revanche, des expériences

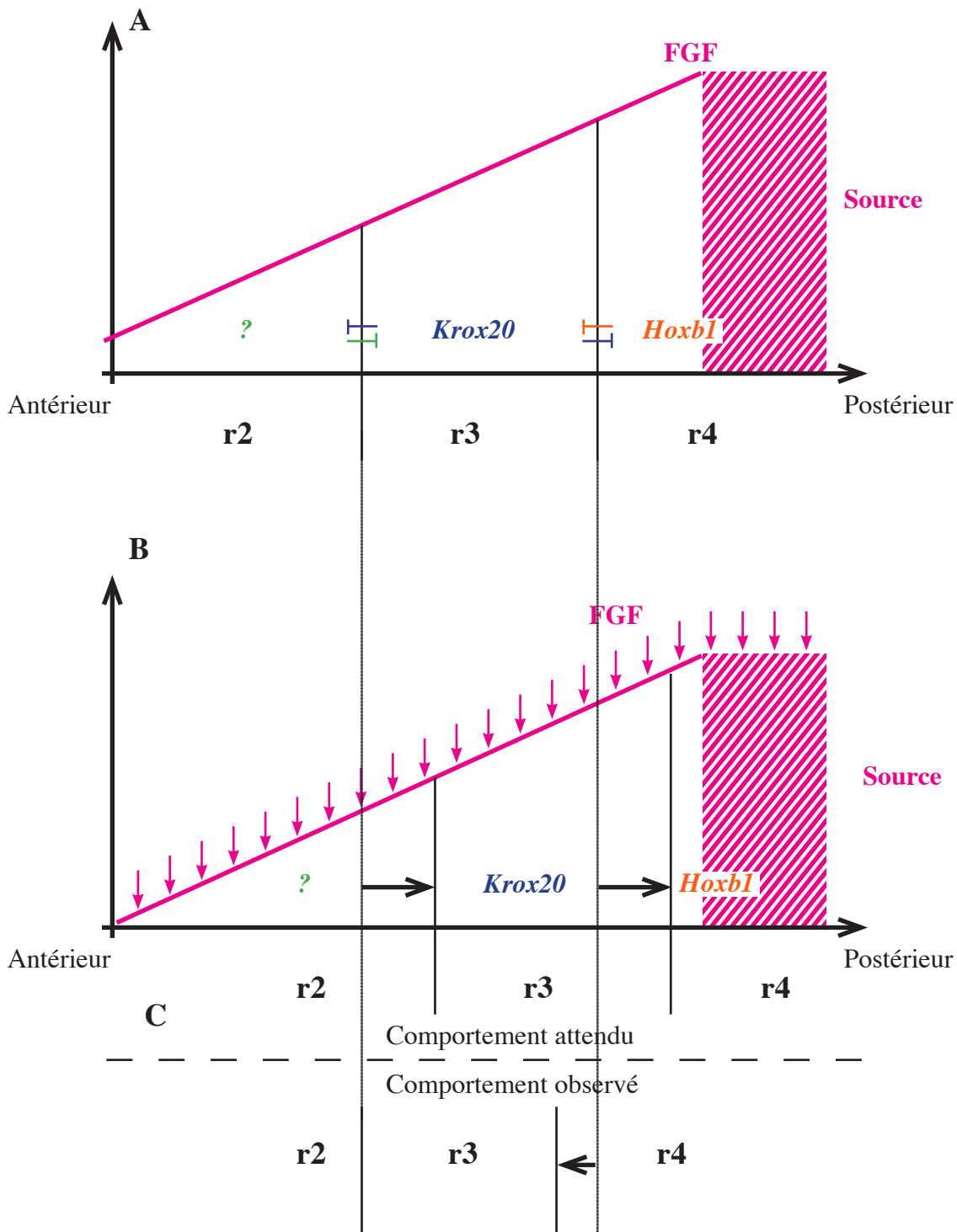


Figure 48. **Déplacement attendu des frontières de r3 si l'action des FGFs suivait le modèle classique pour un morphogène diffusant depuis r4.**

Le modèle classique d'identité positionnelle définie par un morphogène est celui du « Drapeau Français » où les frontières entre territoires correspondent aux seuils d'activation de gènes spécifiquement exprimés dans ces territoires et inhibant l'expression de leurs voisins (A). Dans ce modèle, la baisse de la quantité en morphogène entraîne le déplacement des frontières vers la source de production (B), ce qui n'est pas observé dans le rhombencéphale puisque la frontière r2/r3 n'est pas modifiée tandis que r3/r4 est déplacée antérieurement, suite à un traitement inhibiteur des FGFs (C).

de perte de fonction sur ces facteurs laissent supposer que leur niveau d'expression est crucial pour relayer l'activité FGF dans r3 et sur *krox20*.

Pour tester cette hypothèse, nous avons observé comment la modulation du signal FGF modifie le profil d'activité de l'élément C. De façon intéressante, il est montré qu'une perte ou qu'un gain de fonction FGF entraînent respectivement une baisse ou une hausse importante du niveau d'activité de l'élément C. En revanche, le gradient rostro-caudal d'activité de l'élément C est maintenu et la région de plus forte activité est toujours située au niveau de la future frontière r2/r3. En s'appuyant sur des travaux récents de Yassine Bouchoucha, précédent doctorant au laboratoire (Bouchoucha et al., en préparation), ayant montré que l'élément autorégulateur A constituait un interrupteur moléculaire bistable dont le déclenchement engage les cellules vers un destin '*krox20* positif' r3 ou r5, il est proposé que le positionnement de la frontière r3/r4 découle du profil d'activité en gradient de l'élément C et se situe au niveau AP du gradient dont la traduction en terme de production transcriptionnelle correspond au seuil de déclenchement de l'élément A (voir figure 7). Ainsi, en modulant le niveau général d'activité de l'élément C, les FGFs conditionnent le positionnement de r3/r4 en déplaçant la coordonnée AP à laquelle le seuil de déclenchement de l'élément A est atteint.

Des expériences de perte de fonction sur les facteurs *erm* et *pea3* confirment l'implication de ces facteurs et l'importance de leur niveau d'expression pour l'activité de l'élément C. Parallèlement, il est montré que le site SP/KLF situé sur l'élément C joue un rôle central dans la régulation de son activité par les FGFs. En effet, l'élément C muté pour ce site présente une activité réduite et n'est plus sensible à la modulation du signal FGF. Le facteur sp5l, homologue ichthyen de Sp5, a été identifié comme un activateur direct se fixant sur la boîte SP/KLF et des expériences sont en cours pour prouver qu'il est un médiateur de la régulation de l'élément C par les FGFs.

En conclusion, cet article présente un mode d'action original des FGFs dans la mise en place du territoire r3, reposant sur l'activité en gradient de l'élément C dont la modulation du niveau global d'intensité conditionne le positionnement de la frontière postérieure. Les acteurs moléculaires responsables de cette modulation par les FGFs sont identifiés ou en cours d'identification.

Les expériences présentées dans cet article ont été menées essentiellement par Charlotte Labalette et Yassine Bouchoucha. Ma contribution, secondaire, concerne trois

aspects. Le premier est essentiellement indirect et résulte de la redéfinition de l'élément C qui a permis la réalisation de la plupart des études impliquant celui-ci. En effet, la nettement plus grande reproductibilité du profil d'activité associé à l'élément C redéfini a permis d'interpréter de façon fiable des expériences dont les résultats sont souvent subtils bien que significatifs. Ensuite, l'établissement de la cartographie transcriptomique présentée en II a constitué un outil d'aide à l'identification des effecteurs transcriptionnels impliqués dans le relai de la signalisation FGF, à savoir Sp5, Erm et Pea3. Enfin, mes travaux préliminaires sur le système d'électroporation d'embryons de poulet, présentés en I, ont permis de dévoiler l'importance fonctionnelle de la boîte SP/KLF et du facteur Sp5 et d'engager les expériences plus lourdes de transgénèse chez le poisson, décrites dans cet article. Parmi celles-ci, j'ai réalisé la perte de fonction et le sauvetage du facteur Sp5l sur la lignée *C:gfp* qui met en évidence l'implication de ce facteur dans la régulation de l'élément C.

Morphogenetic action of FGF on r3 relies on element C gradual activity

Yassine Xavier Bouchoucha^{1,2,3,}, Charlotte Labalette^{1,2,3,*}, Johan Le Men^{1,2,3},
Michel Adam Wassef^{1,2,3}, Carole Desmarquet-Trin Dinh^{1,2,3}, Patrick Charnay^{1,2,3*}
and Pascale Gilardi-Hebenstreit^{1,2,3}*

¹Ecole Normale Supérieure, IBENS, Paris Cedex 75230, France

²Inserm, U1024, Paris Cedex 75230, France

³CNRS, UMR 8197, Paris Cedex 75230, France

& These authors contribute equally to this work.

Correspondence should be addressed to P.C., Developmental Biology Section, IBENS, 46 rue
d'Ulm, Paris Cedex 75230, France; tel: 33 1 44 32 36 07; fax: 33 1 44 32 39 88;
mail: charnay@biologie.ens.fr

Running title:

Key words: FGF, Sp51, segmentation, rhombomere, zebrafish

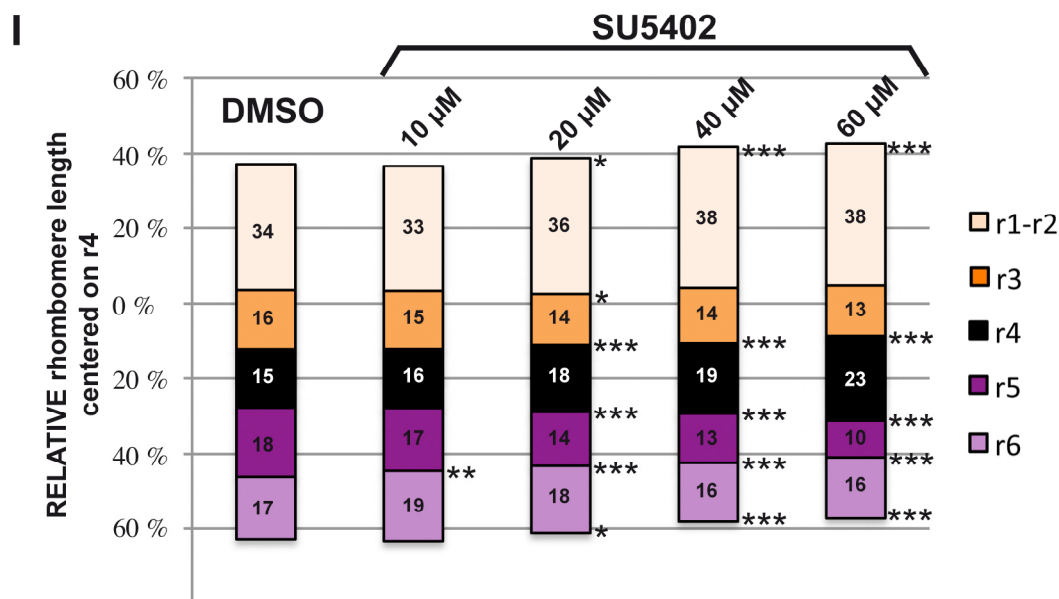
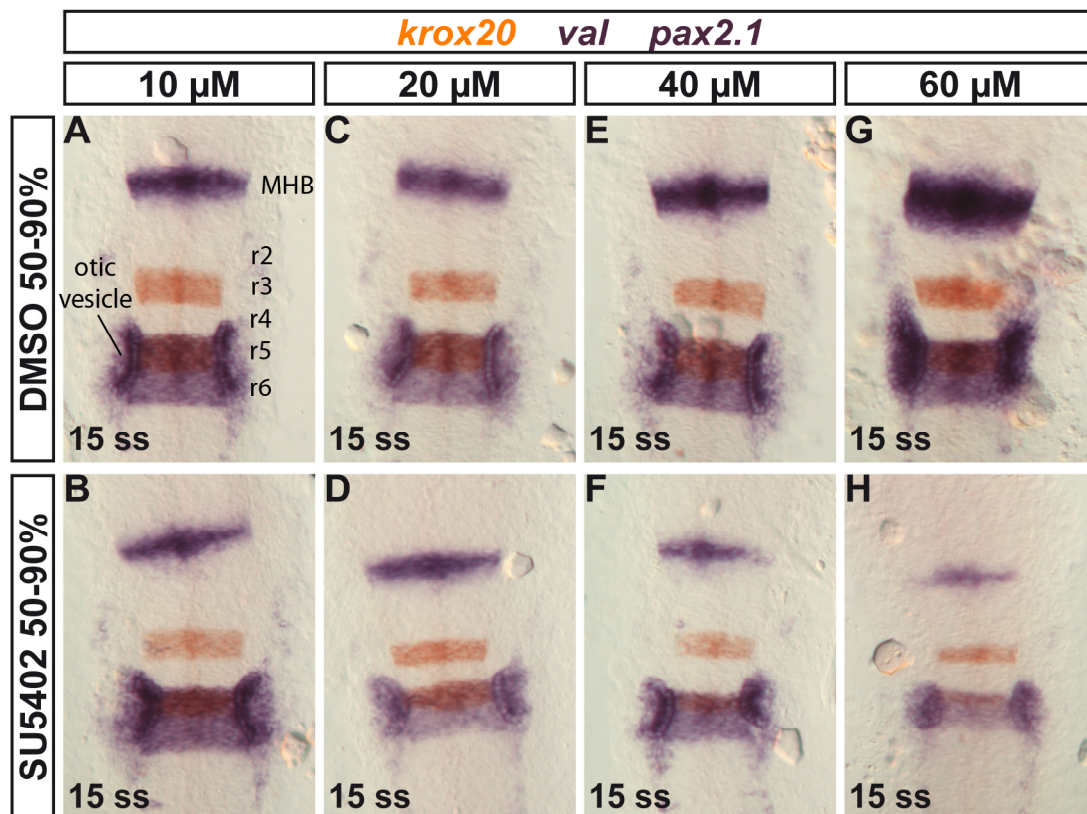


Figure 1. The pattern of segmentation genes is modified in a dose-dependent manner upon alteration of FGF signalling.

(A-H) In situ hybridizations against *pax2.1*, *val* and *krox20* in embryos treated with increasing doses of SU5402, from 50% to 90% epiboly. (I) Graphic representation of the rhombomere boundary positions in each treatment. As the rhombomere sizes are normalized by the total size from r1 to r6 and the hindbrain is represented centered on r4, the positions can be compared. Statistic analysis is represented by asterisks (paired Student t-tests : * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$). The position of each boundary in SU5402-treated embryos was compared with the corresponding position in DMSO-treated embryos. The relative size of each rhombomere is mentioned in the corresponding bar, given the total hindbrain length is 100. These measurements show that the r2/r3 boundary is the only one whose relative position to r4 center is unchanged following SU treatment, the observed change at 20 μM being considered as an artefact.

RESULTS

1. Setting of r3 boundaries by FGF signaling reveals atypical morphogen action of FGFs

To quantitatively assess the position of rhombomere boundaries along the A-P axis, the expression domains of *krox20*, *val* and *pax2.1* were revealed by *in situ* hybridization (Fig. 1A). *krox20* and *val* allow to mark the identity of rhombomeres: r3 is defined by the expression of *krox20*, r4 by the absence of staining, r5 by the coexpression of *krox20* and *val*, r6 by *val* alone. *pax2.1* marks the midbrain-hindbrain boundary (MHB) as well as the otic vesicles. The expression patterns of the three genes define a region of the hindbrain delimited anteriorly by the MHB and posteriorly by the r6/r7 boundary. In this region, the r2/r3, r3/r4, r4/r5 and r5/r6 boundaries are clearly identified.

To investigate the morphogenetic action of FGF on r3 boundaries, we performed an incremental decrease of FGF signaling by treating embryos from 50% to 95% epiboly with increasing doses of FGF inhibitor SU5402 ranging from 10 μ M to 60 μ M. This experiment first shows that the effect of FGF signalling on expression domains of *krox20* and *val* is dose-dependent (Fig. 1A-H). Although suggested in previous studies (Walshe et al., 2002) it had never been assessed directly. Meanwhile, the r1-to-r6 distance was decreased progressively (Fig. 1A-H). To precisely compare the positions of rhombomere boundaries independently from the global hindbrain reduction, we normalized the position values by the total hindbrain length (Fig. 1I). The boundary positions were represented using the centre of r4 as an origin, since this rhombomere is considered as the source of patterning signal. Quantification of the border positions shows that r3 and r5 size are reduced and that the r2/r3 boundary is not affected in SU5402 high dose treatments compared with DMSO conditions, as opposed to all other borders and suggesting that the r3 size reduction is entirely due to r3/r4 relative displacement. At the lowest SU5402 dose, the only modified border is r5/r6, confirming earlier observations that *krox20* expression in r5 is the most sensitive to FGF knock-down (Walshe et al., 2002).

This result was strengthened by the use of transgenic embryos carrying the *hsp:DNFGFR1* construct to knock-down FGF function through another approach. Upon heat-shock, each cell within transgenic embryos expresses a dominant-negative form of the FGF Receptor 1 and therefore becomes non-responsive to FGF ligands. Given the

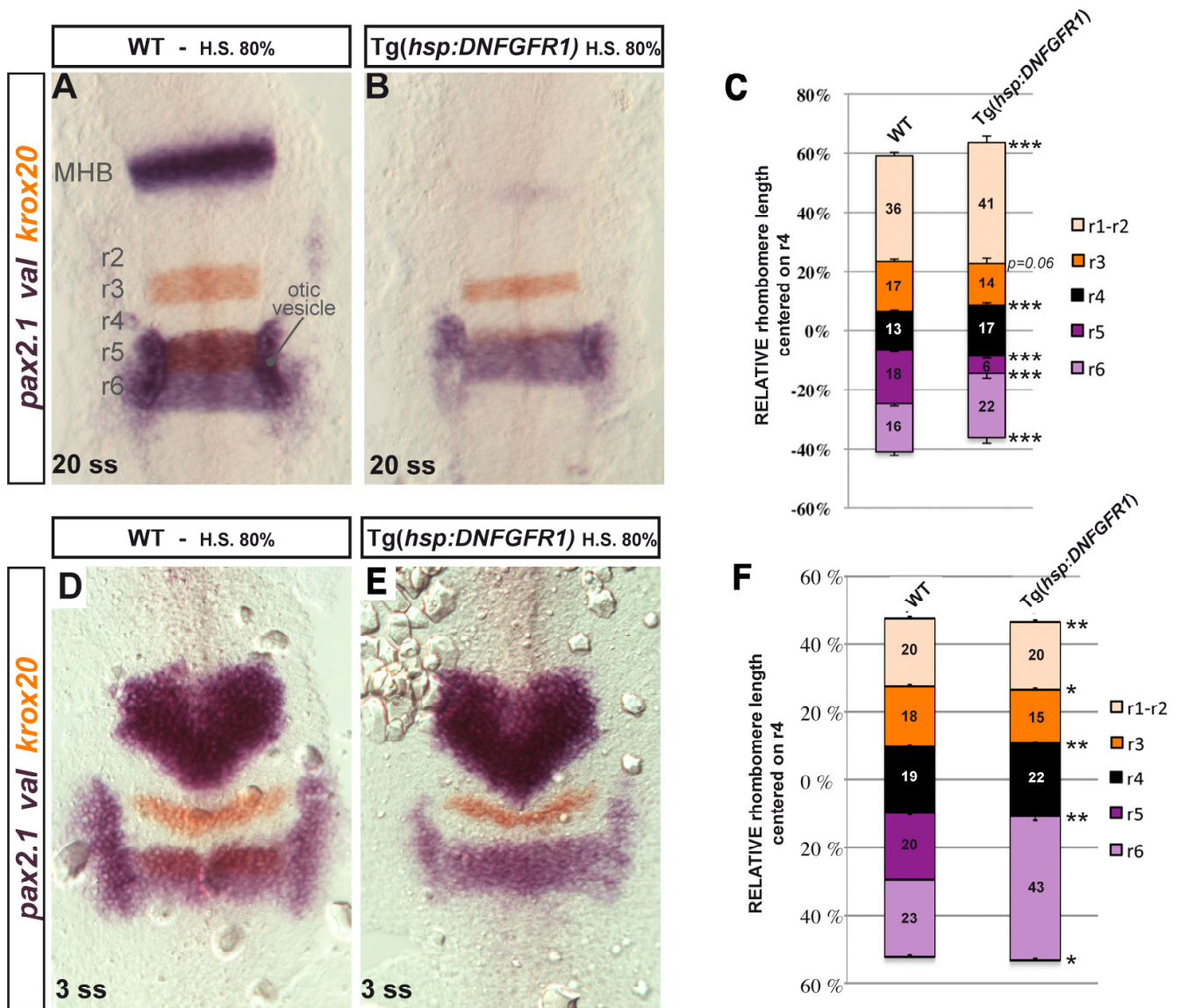


Figure 2. FGF signaling affects the early positioning of borders in the zebrafish hindbrain.

(A, B, D, E) *krox20*, *valentino*, *pax2.1* in situ hybridizations were used to locate rhombomere boundaries in the hindbrain and assess their positions at 20 ss (A,B) and earlier at 3 ss (D,E) in embryos where FGF signaling is impaired by the expression of a dominant-negative form of FGFR1. (C,F) Quantification of FGF knockdown effect on the border positions. Relative size of each territory is represented by taking the center of r4 as an origin. Statistical analysis is represented by asterisks (paired Student t-tests : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). All borders, except r2/r3, are shifted due to marked reduction of r3 and r5.

high stability of *DNFGFR1*, the loss of function can be considered as permanent after the heat-shock. When a 10-minute 37°C heat-shock was performed at 80% epiboly, the expression domains of *krox20* and *val* were reduced in size at 20-somite stage (ss), and the r1-to-r6 distance was decreased of 21% (Fig. 2A and B). Normalization confirmed that by affecting *krox20* and *val* expression domains, FGF knockdown entails overt changes in border positions, with the exception of r2/r3 (Fig. 2C). These patterning defects were already detected at 3 ss. At this stage, the r1-r6 global decrease is only 10% and r3 and r4 borders are shifted in a manner similar than at 20 ss (Fig. 2D-F).

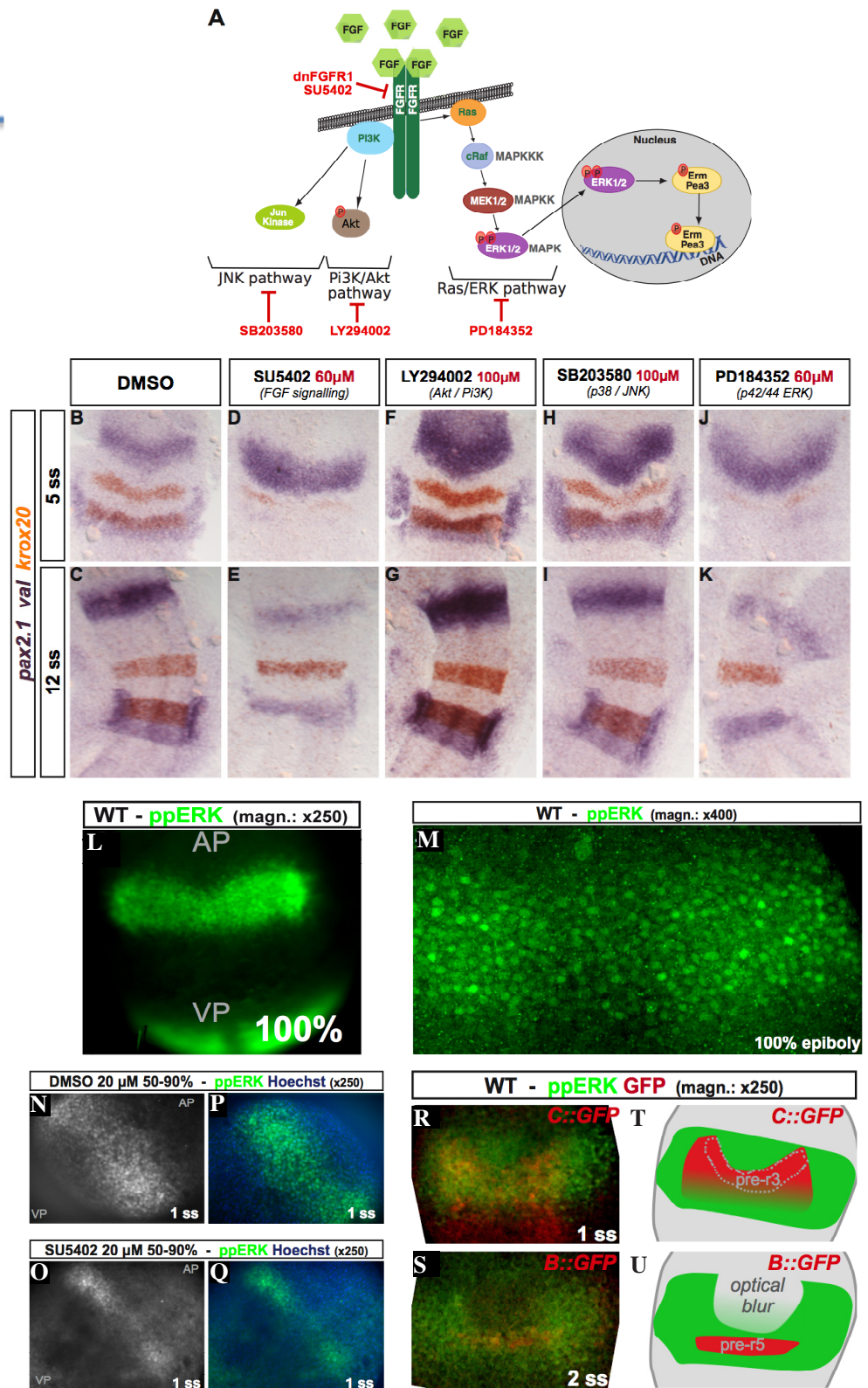
2. No proliferative defect in the anterior hindbrain from FGF loss-of-function

To definitely conclude that boundaries establishment was exclusively under the control of patterning regulation, we have to exclude any proliferation defects induced by FGF downregulation. In a previous study, we showed that the reverse experiment, FGF gain-of-function, does not modify the distribution of proliferative cells in the hindbrain (Labalette et al., 2011). We thus investigated whether FGF loss of function differentially affects cell proliferation. We identified cells in mitosis by immunostaining with an antibody directed against phospho-Histone H3 in wt (n=16) and *hsp:DNFGFR1* transgenic embryos (n=22) at the 3 ss. The immunostaining was combined with detection of *krox20* mRNA by fluorescent in situ hybridization to localize r3. At this stage, r5 was not yet detected in embryos where FGF signal is downregulated. No significant changes in the distribution of mitotic cells were observed in r1-r2 and r3 upon FGF knockdown (Fig. S1) and further experiments are under way to assess it in r4. The parallel demonstration of a non-regionalized effect of apoptosis in FGF knockdown embryos is under way. Thus, provided that the mitosis quantification measurement in r4 shows no significant change, the relative decrease of r3 cannot be explained by differential cell proliferation.

Altogether the data from 1 and 2 demonstrate that rhombomere borders positions in the hindbrain are set up at early stages and does not result from a late adjustment of expression domains controlled by proliferation. Moreover, contrary to what was expected for a classic morphogen diffusing from r4, FGF modulation does not affect the anterior boundary of r3 but only the posterior one, the nearest of the FGF source.

Figure 3. FGF intracellular pathway in the zebrafish hindbrain

(A) Schematic representation of the three reported pathways that can be at stake in cells responsive to FGF ligands: the Jun Kinase pathway, inhibited by the SB203580 compound; the Pi3K/Akt pathway, inhibited by LY294002 and the Ras/ERK MAP Kinase pathway inhibited by PD184352. Our two other FGF loss-of-function approaches, i.e. the use of SU5402 and the hsp:DNFGFR1 line, affect the function of the FGF receptors, thus inhibiting all three intracellular pathways. (B-K) Embryos were treated from 50% to 90% epiboly with the compounds and the concentrations indicated. They were subsequently allowed to develop up to 5 ss or 12 ss. *pax2.1*, *krox20* and *val* in situ hybridizations indicate that the SU5402 phenotype is only recapitulated by the anti-ERK drug. (L) Immunohistochemistry with tyramide amplification of the double phosphorylated form of ERK, noted ppERK, in whole-mount zebrafish embryos pictures under a stereomicroscope. Note that ppERK is also present in the tailbud. (M) High-magnification picture of the ppERK territory at 100% epiboly. To be able to compare qualitatively the level of signal among cells, the immunohistochemistry has been performed without Tyramide amplification, and embryos were visualized under a spinning-disk microscope. (N-Q) Expression of ppERK upon gentle treatment with SU5402 (20 μ M) photographed with a spinning-disk microscope: the band appears narrower in treated embryos (O,Q) compared with control embryos (N,P). The ppERK staining alone is shown on left panels (N, O) while the double staining with Hoechst is shown in right panels (P, Q). (R-U) Double-immunolabelling of ppERK and GFP in the *cC::GFP* (R) and *cB::GFP* transgenic lines (S). GFP respectively reveals pre-r3 and pre-r5 as more clearly indicated in the schematics (T,U). In S, the ppERK band displays an artefactual central round-shaped zone of low intensity, resulting from a mis-optimized optical sectioning procedure. In R, the caudal GFP staining (in red) is non specific. Note that, for this experiment only, the element C used is the former one Cinit (see part I). AP: Animal Pole, VP: Vegetal Pole



3. Ras/ERK pathway in zebrafish hindbrain mediates FGF signaling action but does not carry positional information for r3

To clarify how FGF molecules regulate r3 size and borders, we determined which intracellular pathway transmits FGF signal. FGF ligands activate FGF receptors at the cell surface that in turn trigger phosphorylation cascades along three possible paths: PI3K/Akt, p38/JNK or the Ras/ERK (Fig. 3A). The Ras/ERK pathway has been shown to be active in the chick hindbrain and mediate FGF action on segmentation genes (Aragon and Pujades, 2009). We show here that this finding also applies in zebrafish: embryos treated with the anti-ERK drug PD184352 exhibit the same alterations in *krox20* and *val* expressions as embryos treated under the same conditions with SU5402 that antagonizes all pathways (Fig. 3B-E,J,K). In contrast, drugs directed against the PI3K/Akt and p38/JNK pathways had no effect (Fig. 3F-I).

Presence of double phosphorylated ERK (ppERK) in the zebrafish hindbrain was assessed by immunohistochemistry. A band of ppERK appears at 90% epiboly and reinforces at 100% epiboly (Fig. 3L). From 2 ss onwards, the band fades away (data not shown). We then confirmed that ppERK is regulated by FGF signaling. For that purpose, embryos were treated with SU5402 from 50% to 90% epiboly and ppERK level was assessed at 1 ss. The use of 60 μ M of SU5402 led to the complete disappearance of ppERK from the hindbrain (data not shown). However, the behaviour of ppERK could be evidenced in gentle 20 μ M SU5402 treatments (Fig. 3N-Q): the size of the ppERK band was found shortened along its AP axis, covering 6 cell rows on average instead of 15 in DMSO condition. We then investigated whether ppERK signal carries some positional information for r3. A close-up on the ppERK band at 100% epiboly does not reveal obvious gradual distribution from the centre of the band towards its periphery (Fig. 3M). To position this band in the hindbrain, we made use of a transgenic reporter line where *Gfp* expression was driven by element C, a cis-regulatory element of *Krox20* inducing expression in r3 and at a lower level in r4. Double staining of ppERK and GFP reveals that the anterior limit of the ppERK band is set anteriorly to r2 (Fig. 3R,T). The posterior limit was estimated at the posterior boundary of r6 thanks to the use of another transgenic line in which *Gfp* expression is induced by element B in r5 (Fig. 3S,U), suggesting that ppERK band is centered on r4.

These data indicated that ppERK staining is homogenous in the r2-r6 domain and may not propagate directly the positional information for setting r3 boundaries

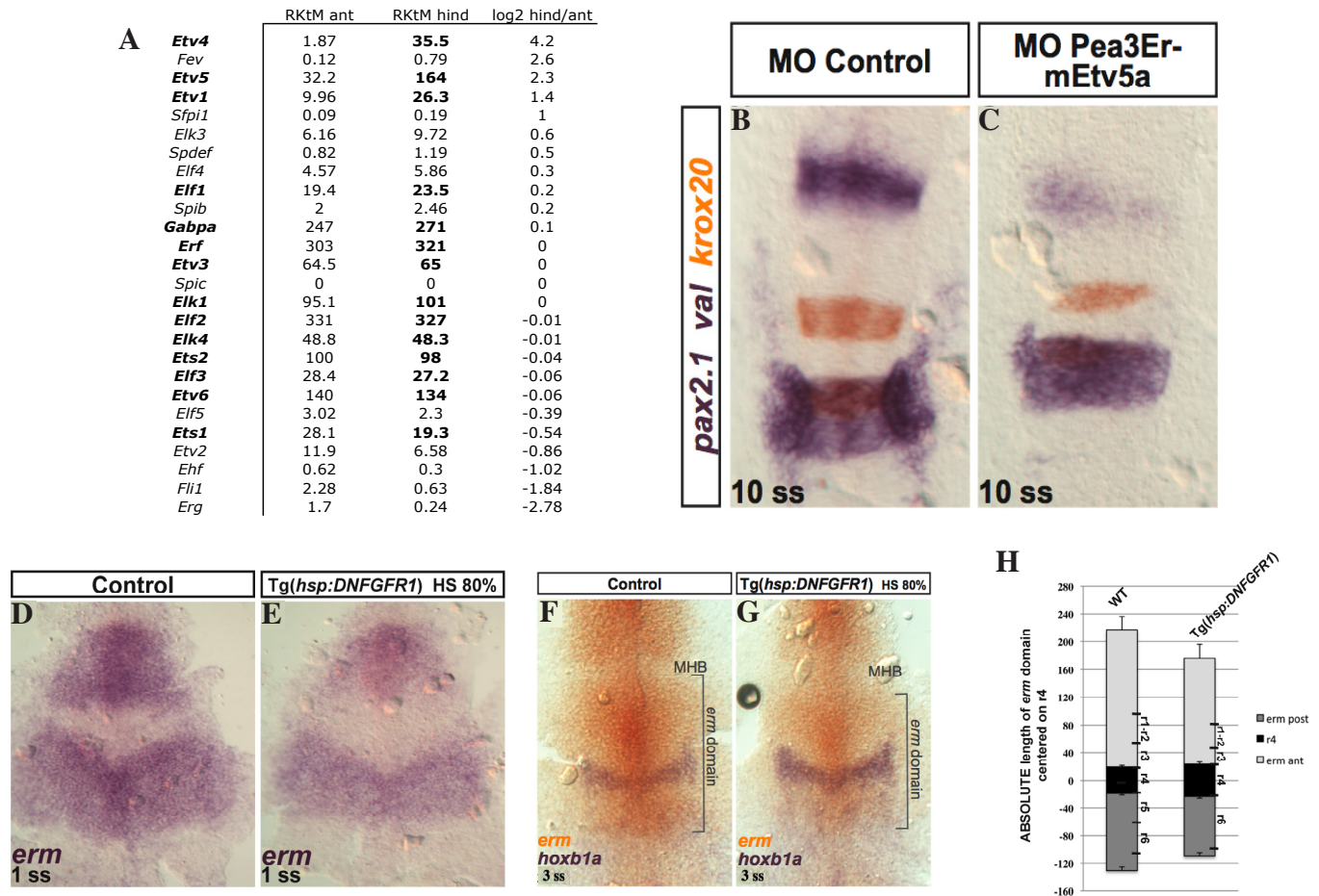


Figure 4. Ets factors expression level is critical for FGF signaling morphogen action in anterior hindbrain

(A) RNA-Seq measurements of Ets factors level expression in the mouse anterior neural tube (ant) and the hindbrain (hind) at 1-4 ss show that *Etv4* and *Etv5* are the most highly over-expressed in the hindbrain (only genes above 20 RKtM in the hindbrain have been taken into account, in bold). (B,C) Morpholinos disrupting *pea3*, *erm* and *etv5a* translation were injected in embryos at the 1-cell stage. At 1 ss, the patterns of the segmentation genes are severely affected in a manner similar to the *hsp:DNFGFR1*-mediated loss-of-function (Fig. 2D,E). (D,E) In situ hybridizations directed against *erm* in control (D) and FGF knocked-down embryos at 1 ss (E). (F,G) The same result is shown with a co-labeling of *erm* (orange) and *hoxb1a* (purple) at 2 ss. This allows to position the *erm* domain according to r4 (H). (H) The size of *erm* and *hoxb1a* domains was quantified; the absolute values are represented centered on r4. Positions of rhombomeres are indicated, based on absolute values of border positions measured at the same stage in Fig. 2E. RKtM : Reads per Kilobases per ten of Millions of mapped reads, log2 : logarithm (base 2).

positions. These results are consistent with the fact that r3 anterior border is insensitive to FGF signalling.

4. Ets factors expression level is critical for FGF signaling morphogen action in anterior hindbrain

To establish how Ras/ERK pathway mediates FGF signaling regulation of *Krox20* domain size and borders in r3, we looked for transcriptional effectors activated by Ras/Erk. Upon FGF activation, ppERK translocates into the nucleus and phosphorylates target transcription factors, of which the most studied belong to the Ets family (Wasylyk et al., 1993). As we were looking for factors that could provide positional information to *Krox20*, we focused on genes specifically expressed in the hindbrain. The establishment of the transcriptomic map of the mouse early hindbrain by RNA-Seq (Le Men et al, in preparation) shows that among the 26 mouse members of the Ets family, *Pea3* (*Etv4*) and *Erm* (*Etv5*) are the most highly over-expressed in the hindbrain (Fig. 4A). Zebrafish homologues *etv5b* and *etv4* are also expressed in the hindbrain in a uniform domain covering the MHB-to-r6/r7 region (Raible and Brand, 2001; Roehl and Nüsslein-Volhard, 2001).

Morpholinos directed against these two members were injected in embryos at the 1-cell stage but led to very minor changes in the segmentation genes pattern (data not shown). However, when they were injected in combination with a third morpholino, directed against the *erm* paralogue *etv5a*, the extension of *krox20* and *val* domains was found similarly reduced compared with FGF signaling downregulated embryos (Fig. 4B,C).

We then investigated how FGF signaling regulates *erm* expression pattern. Upon a 10-min heat shock performed at 80% epiboly, *hsp:DNFGFR1* transgenic embryos expressed *erm* in a narrower band in the hindbrain region compared to their WT siblings (Fig. 4D,E). In order to establish the position of the limits of the *erm* domain, double in situ hybridization for *erm* and *hoxb1a* was performed in *hsp:DNFGFR1* transgenic embryos. Expression of *hoxb1a* in r4 enabled us to position the *erm* domain according to the FGF source (Fig. 4F,G) while the border positions of other rhombomeres was inferred from heat-shocked *hsp:DNFGFR1* embryos at the same stage in Fig. 2E. Such measurements indicate that both anterior and posterior limits of *erm* region retracted in FGF signaling loss-of-function conditions (Fig. 4H). Analyzing the

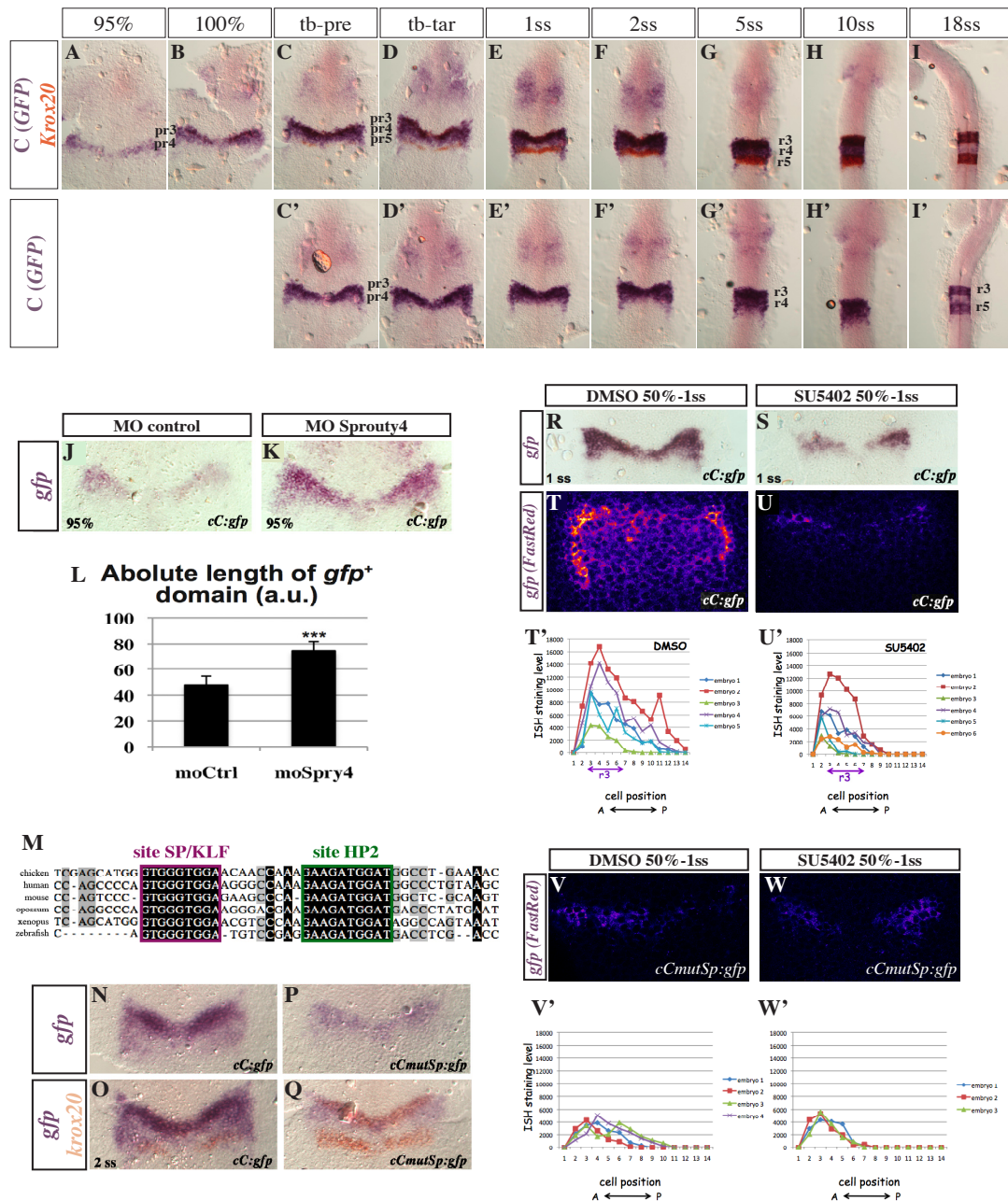


Figure 5. FGF signalling homothetically modulates element C activity pattern.

(A-I') In situ hybridizations against *krox20* (orange) and *gfp* (purple) in *cC:GFP* transgenic embryos from 95% epiboly to 18 ss. Upper panels show the double in situ experiment while lower panels only show the *gfp* profile. (J-L) FGF gain-of-function experiments were performed by morpholino-mediated downregulation of *sprouty4* expression, as described in Labalette et al., 2011. It results in an increase level of C activity, as well as an extension of the C territory, as quantified in L (paired student t-test: *** p<0.01). (M) Alignment of mammals, chicken, xenopus and zebrafish nucleotide sequences of a subpart of element C showing the presence of a conserved putative SP/KLF site (squared in purple). The functionally important neighbouring Hox/Pbx site (HP2, Wassef et al., 2008) is indicated (squared in green). (N-Q) Reporter transgenic line carrying chicken element C mutated in the SP/KLF site was generated. In situ hybridizations for *gfp* alone (N, O) or for *gfp* and *krox20* (P, Q) carried out at 2 ss reveal a decreased reporter activity in the *cCmutSp:gfp*. Two others transgenic lines present the same decrease of activity compared to *cC:gfp* lines. (R-W') FGF knockdown by SU5402 treatment on *cC:Gfp* results in reduction of element C activity and of the extent of its territory (R, U'). However, the activity of element C mutated for the Sp site was not further reduced or very limitedly (V, W'). In situ hybridizations were revealed with NBT/BCIP (R,S) or FastRed fluorescent compound (T,U,V,W). The gradient of C activity is better evidenced in the latter case and could be visualized by fluorescence intensity measurement in individual cells along the AP axis in several embryos (T',U',V',W'). This quantification also allows to show that the intensity of the mutated element C is not affected upon FGF knockdown (V', W'). r3 size was inferred from fluorescence in situ hybridization against *Krox20* in embryos of the same stage.

position of each rhombomere border reveals that r3 borders were included in the *erm* domain, even when the FGF signaling is downregulated. Moreover, consistently with ppERK domain, *erm* expression is homogeneous as well.

These data shows that no positional information comes from the limit of FGF signaling active domain. However, FGF signaling downregulation results in a global decrease of *erm* expression in the whole hindbrain band suggesting that the level of *erm* might be crucial for FGF signaling action on *krox20* expression. To test this hypothesis, we analyzed in particular the transcriptional effect of FGF on *krox20* expression. The regulation of *krox20* expression involves three cis-regulatory elements termed A, B and C. B and C are responsible for the initiation respectively in r5 and r3 while A is an autoregulatory element (Chomette et al., 2006). We recently showed that FGFs act exclusively on *krox20* initiation, regulating the activity of both elements B and C (Labalette et al., 2011). In the following sections, we focus on the FGF-dependent regulation of C and its implication in the positioning of the r3/r4 border.

5. Homothetic modulation of element C activity gradient by FGF signaling

In order to determine how FGF signaling regulates element C activity, we generated a zebrafish reporter transgenic line *cC:gfp* carrying *gfp* under control of the chick element C. In contrast to chick element C, the homologous sequence in zebrafish failed to generate robust activity in r3 prompting us to use the chick element C (data not shown). We analyzed the activity of element C by *in situ* hybridization of *gfp* and *krox20* in order to capture its full dynamics (Fig. 5A-I').

The onset of *gfp* expression occurs at 95% epiboly, shortly before *krox20* expression is initiated in r3 (Fig. 5A). From the 100% epiboly stage, the activity of element C is strengthened in the r3-r4 domain revealing a gradual AP decrease from the r2/r3 border towards the caudal hindbrain (Fig. 5B-C'). At late tailbud stage, the activity of C becomes uniform and clearly reinforced in its anterior domain coinciding with *krox20* expression, ie the presumptive r3, while posteriorly to r3/r4 it still shows a gradual decrease towards the caudal hindbrain (Fig. 5D,D'). This reinforced activity in r3 compared to r4 is maintained up to the 10 ss (Fig. 5D-H') and was found in three independent transgenic lines, excluding any insertion artefactual effect. After 10 ss, only weak residual activity of C is detected in r4 while a strong signal is observed in r3 and r5 (Fig. 5I,I'). The gradual decrease of element C activity from the r3/r4 border towards the

posterior hindbrain is better evidenced when C activity is revealed by fluorescent *in situ* hybridization (Fig. 5T,T'): the anterior limit of element C activity is sharp while the posterior limit defines a gradient.

We then investigated how this activity pattern is affected by FGF signaling modulations. First we carried out FGF signaling gain of function using Spry4 morpholino (Spry4mo) previously described to enhance *krox20* initiation in r3 (Labalette et al., 2011). Spry4 downregulation in *cC:gfp* transgenic embryos led to a global enhancement of element C activity at 95% epiboly in both pre-r3 and pre-r4 (Fig. 5J,K). This phenotype is confirmed by quantifying the enlargement of the *gfp* positive domain, which displays a 54% increase in Spry4 morphants (n=17) compared to control (n=7) (Fig. 5L, *t*-test, $p < 0.0001$). Element C activity enhancement in Spry4 morphants also allows to show that element C activity gradient is already set up at 95% epiboly when *krox20* expression is initiated, suggesting that this gradient is not clearly observed in WT embryos at this early stage because of *in situ* hybridization detection limits. Thus, FGF signaling gain of function homothetically increases element C activity.

We also performed FGF loss of function and observed its effect on element C activity pattern. Treatment of *cC:gfp* transgenic embryos with SU5402 from 50% epiboly led to a decrease of element C activity at 1 ss associated with an anterior shift of the posterior *gfp* domain (Fig. 5R,S, double staining pictures with *Krox20* demonstrating that element C anterior boundary is unchanged and still coincides with the r2/r3 boundary are not shown). Quantification of element C activity by fluorescent *gfp in situ* hybridization confirms anterior retraction of the posterior limit as well as the reduced level of element C activity in r3 (Fig. 5T-U').

Finally, we searched the sequences inside element C responsible for its regulation by FGF signaling. We investigated a putative binding site for the Sp/Klf transcription factors family because it was highly conserved between vertebrates (Fig. 5M) and given some members of the Sp/Klf family have been reported to be involved in FGF signaling mediation (Zhao et al., 2003; Sun et al., 2006; Wang et al., 2010). Interestingly, this SP/Klf site is located close to a Hox/Pbx binding site that we have previously shown to be required for element C activity in r3 (Wassef et al., 2008; partie I). We assessed the functional significance of this putative Sp/Klf binding site to element C by mutating it in the context of the *cC:gfp* reporter construct and generating a zebrafish transgenic line (*cCmutSp:gfp*). As shown in Fig. 5N-Q, this mutation strongly diminishes the reporter

activity in r3-r4, indicating that this site is crucial for *in vivo* activity. In addition, this weakening of element C activity is associated with the anterior retraction of its domain posterior limit, similarly to what is observed upon FGF downregulation (compare Fig. 5T-U' with V,V'). We then showed that the mutant element C is no longer sensitive to FGF signaling as the residual activity in *cCmutSP:gfp* embryos is not altered furthermore by SU5402 treatment or very limitedly (Fig. 5V-W'). We are currently performing the symmetric FGF gain-of-function experiment by injection of morpholinos against *Spry4* in *cCmutSp:gfp* embryos (preliminary results show no reinforcement of element C activity in r3-r4, suggesting that the Sp/Klf binding site is absolutely required to mediate FGF signal on element C).

Altogether these results show that FGF signaling operates as a rheostat on the level of C activity mainly through its conserved putative Sp/Klf binding site.

6. *sp5l* mediates FGF signaling in r3 by direct binding to element C

We then searched the transcriptional effectors of FGF signaling controlling element C activity. We first showed that *erm*, *pea3* and *etv5a* loss of function by morpholinos injection results in a significant decrease of element C activity associated with a posterior retraction similar to what is observed in FGF loss-of-function conditions (Fig. 6A,B), demonstrating that FGF establishment of the r3 posterior border through element C gradient modulation is regulated by the level of Ets factors.

In parallel, we investigated the Sp/Klf factor Sp5 as the mouse hindbrain transcriptomic map positions it as the only Sp/Klf member to be specifically expressed in the hindbrain at significant levels (Fig. 6C). Moreover, a previous study showed that the zebrafish homologue *sp5l* is necessary for *krox20* expression in r3 and can rescue the downregulation of *krox20* induced by *DNFGFR1* overexpression (Sun et al., 2006). In addition, *sp5l* expression can be ectopically induced by *FGF17b* mRNA injection at epiboly stage (Sun et al., 2006).

To investigate whether Sp5l factor can bind the potential Sp/Klf binding site *in vitro*, we performed gel retardation experiments with a 21-bp oligonucleotide surrounding the sequence (Fig. 6D). This oligonucleotide was incubated with nuclear extracts prepared from COS-7 cells transfected with a HA-tagged mouse *Sp5* expression vector. This led to the formation of a retarded band, which could be specifically supershifted by an anti-HA antibody. The intensities of both the retarded and the

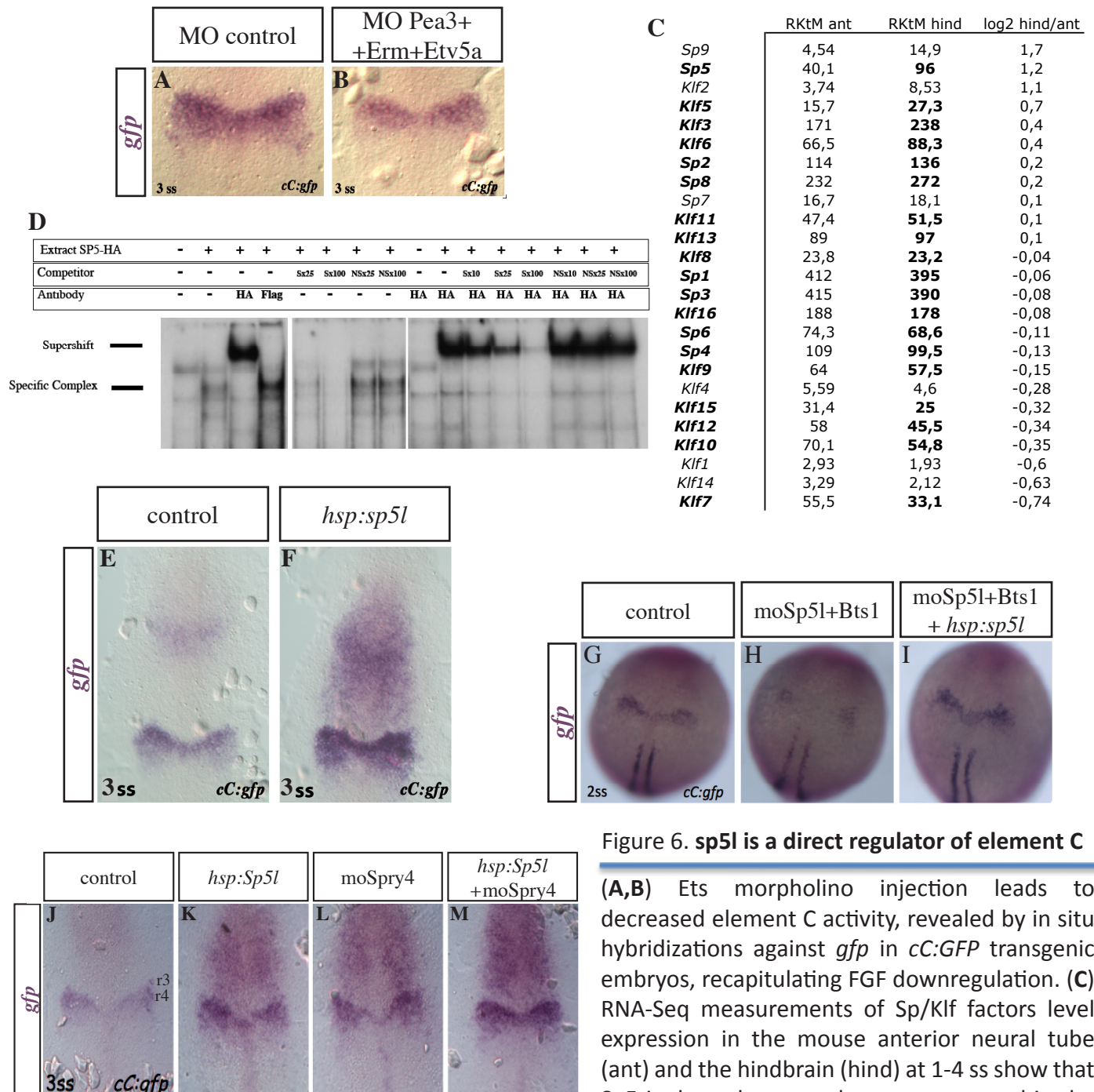


Figure 6. **sp5l is a direct regulator of element C**

(A,B) Ets morpholino injection leads to decreased element C activity, revealed by in situ hybridizations against *gfp* in *cC:GFP* transgenic embryos, recapitulating FGF downregulation. (C) RNA-Seq measurements of Sp/Klf factors level expression in the mouse anterior neural tube (ant) and the hindbrain (hind) at 1-4 ss show that Sp5 is the only one to be over-expressed in the hindbrain (log2 fold-enrichment > 1) and expressed at a significant level (RKtM > 20, in bold). (D) Gel retardation analyses performed on protein extracts from COS-7 cells before (-) of after transfection with HA-tagged mouse *Sp5* expression vector (+). Protein extracts were incubated with a 21bp double strand oligonucleotide containing the chick version of the Sp/Klf site and the surrounding sequences. The specificity of the SP5 binding was established by competition with a double strand specific oligonucleotide (S : GGTTGTTCCACCCACCCAT) carrying the Sp/Klf binding site or a non specific oligonucleotide (NS : GGTTGTTCCCCCCCCCAT) unable to bind these factors. (E,F) *sp5l* gain of function was performed on *cC:gfp* transgenic line by injecting a plasmid carrying *sp5l* cDNA under control of a heat-inducible promoter (*hsp*). A 10-min heat shock at 95% epiboly led to increased element C activity in the hindbrain and ectopic one in the anterior neural plate at 3 ss. (G-I) *sp5l* loss of function by morpholino injection against Sp5l and its orthologue Bts1 results in an important decrease of element C activity that can be rescued by injection of the *hsp:sp5l* construct followed by heat-shock. (J-M) FGF gain of function by Spry4 morpholino injection combined with *sp5l* overexpression by *hsp:sp5l* mRNA injection followed by heat-shock results in a stronger increase of element C activity both in r3-r4 territories and in the ectopic anterior region (M) than each gain of function performed individually (K, L), supporting the fact that FGF modulation of Sp5l action on element C could be independent from *sp5l* expression regulation.

(A,B) Ets morpholino injection leads to decreased element C activity, revealed by in situ hybridizations against *gfp* in *cC:GFP* transgenic embryos, recapitulating FGF downregulation. (C) RNA-Seq measurements of Sp/Klf factors level expression in the mouse anterior neural tube (ant) and the hindbrain (hind) at 1-4 ss show that Sp5 is the only one to be over-expressed in the hindbrain (log2 fold-enrichment > 1) and expressed at a significant level (RKtM > 20, in bold). (D) Gel retardation analyses performed on protein extracts from COS-7 cells before (-) of after transfection with HA-tagged mouse *Sp5* expression vector (+). Protein extracts were incubated with a 21bp double strand oligonucleotide containing the chick version of the Sp/Klf site and the surrounding sequences. The specificity of the SP5 binding was established by competition with a double strand specific oligonucleotide (S : GGTTGTTCCACCCACCCAT) carrying the Sp/Klf binding site or a non specific oligonucleotide (NS : GGTTGTTCCCCCCCCCAT) unable to bind these factors. (E,F) *sp5l* gain of function was performed on *cC:gfp* transgenic line by injecting a plasmid carrying *sp5l* cDNA under control of a heat-inducible promoter (*hsp*). A 10-min heat shock at 95% epiboly led to increased element C activity in the hindbrain and ectopic one in the anterior neural plate at 3 ss. (G-I) *sp5l* loss of function by morpholino injection against Sp5l and its orthologue Bts1 results in an important decrease of element C activity that can be rescued by injection of the *hsp:sp5l* construct followed by heat-shock. (J-M) FGF gain of function by Spry4 morpholino injection combined with *sp5l* overexpression by *hsp:sp5l* mRNA injection followed by heat-shock results in a stronger increase of element C activity both in r3-r4 territories and in the ectopic anterior region (M) than each gain of function performed individually (K, L), supporting the fact that FGF modulation of Sp5l action on element C could be independent from *sp5l* expression regulation.

supershifted bands are gradually decreased when using increased concentration of an unlabelled specific competitor but not if using a non-specific competitor, indicating that the binding of Sp5 factor to the Sp/Klf sequence is specific.

We then assessed whether element C was indeed regulated by Sp5l factor. We first carried out gain-of-function experiment by injecting in the *cC:gfp* transgenic line a *tol2* plasmid carrying *sp5l* cDNA under control of a promoter inducible by heat shock (*hsp*). A 10-minute heat shock performed at 95% epiboly stage results in the reinforcement of element C activity in r3-r4 domain similar to the phenotype obtained with *Spry4mo* injection, thus phenocopying FGF gain of function (Fig. 6E,F). Moreover, *sp5l* gain of function led to ectopic element C activity anteriorly. We also analyzed *sp5l* loss of function effect on the *cC:gfp* transgenic line. Morpholinos injection against Sp5l and its orthologue *Bts1* leads to a dramatic decrease of element C activity which is efficiently rescued by coinjection of the *pTol2-hsp:sp5l* plasmid followed by heat-shock at 95% epiboly (Fig. 6G-I). These data demonstrates that Sp5l is a direct transcriptional activator of element C.

As *sp5l* gain- and loss-of-function associated phenotypes of element C pattern are very similar to the ones obtained after FGF modulation, we investigated whether the Sp5l factor was indeed essential for the FGF signaling-mediated regulation of element C. We did not detect any change in *sp5l* expression in embryos treated with SU5402 (data not shown). However, FGF could alter Sp5l activity through other mechanisms such as post-translational modification. Supporting this point, preliminary results show that FGF gain of function by *Spry4* morpholino injection in embryos overexpressing *sp5l* thanks to a heat shock following *hsp:sp5l* RNA injection leads to a stronger increase of element C activity – both in the r3-r4 territories and ectopically in the anterior region – than each gain of function performed individually (Fig. 6J-M), suggesting that FGF may enhance Sp5l activity on element C in a way independent from *sp5l* expression regulation. We are currently performing epistatic experiments and combining FGF downregulation through SU5402 treatment with *sp5l* overexpression on *cC:gfp* embryos (under way). Finally, performing FGF gain of function in embryos in which *sp5l* expression is downregulated by morpholino injection will allow us to determine if Sp5l is absolutely required to mediate FGF action on element C.

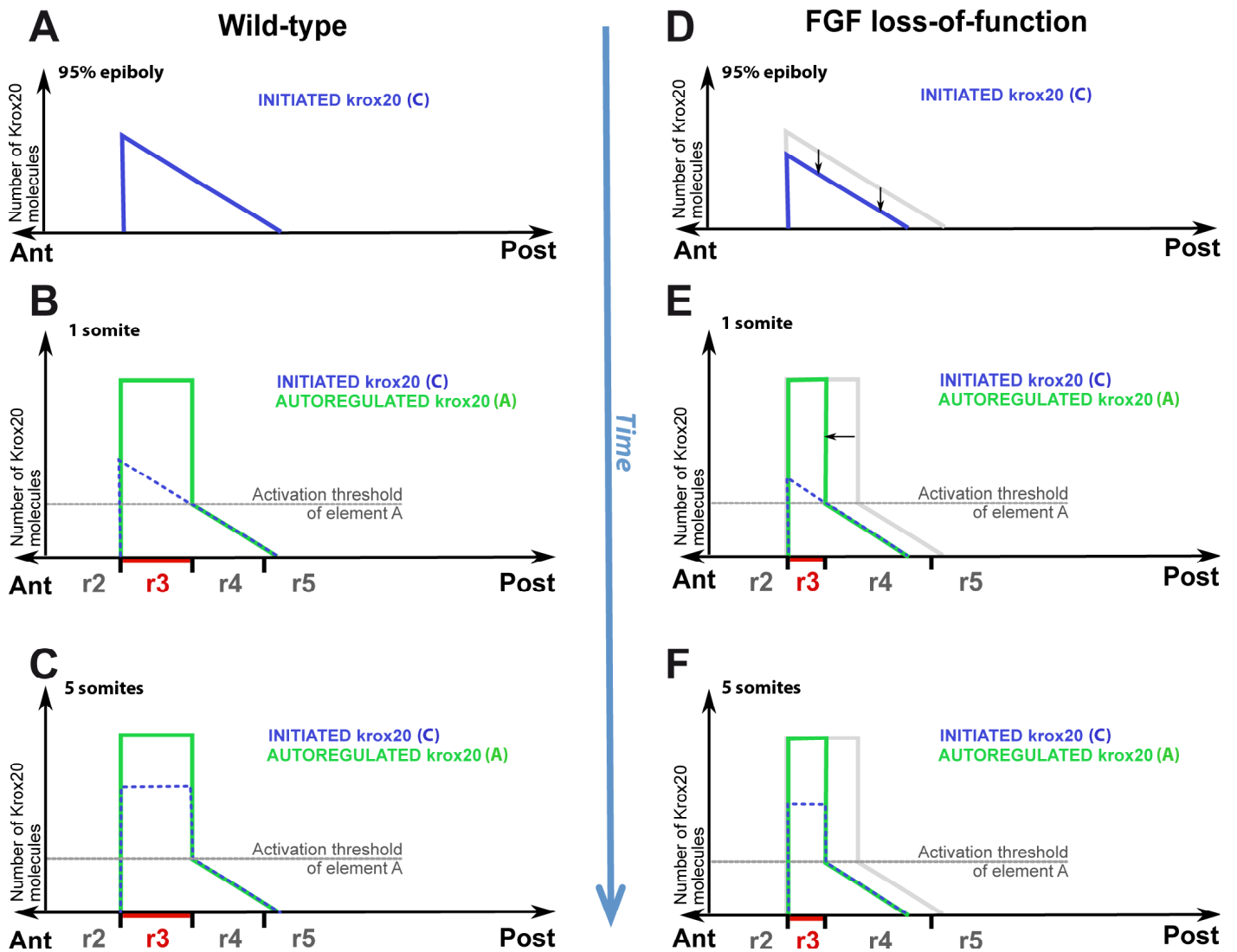


Figure 7. **Model for the FGF-regulated positioning of the r3/r4 boundary**

(A-C) Element C activity profile is asymmetrical: the anterior limit is straight while the posterior end declines gradually (A). Given cells durably express *krox20* only if they activate the autoregulatory loop, the cells that commit to the *krox20*-positive fate lie in the region where the activity of C is above the activity threshold of element A (B). Secondly, the initiation level is upregulated in cells with high *krox20*, probably through an indirect loop that involves *hoxa2* and *hoxb2* (C). (D-F) Under conditions of FGF loss-of-function, the activity of C is lowered (D), hence a smaller territory in which cells activate the *krox20* autoregulatory loop. The r3/r4 border is therefore shifted anteriorly (E). Subsequent upregulation of C activity in the resulting r3 occurs accordingly in a smaller domain (F).

7. A model of FGF-dependent positioning of the r3/r4 boundary.

We showed recently that *krox20* autoregulatory element A functions as a high-pass filter for the initiation signal: in case of low initiation for instance, cells do not contain enough Krox20 proteins to reach the activation threshold of A and to trigger the A autoregulatory loop and will commit to the *krox20*-negative fate (Bouchoucha et al., in preparation). We propose here that initiation in r3 displays an asymmetric shape with a sharp anterior border and a gradual posterior decline of activity (Fig. 7A). These two properties of *krox20* cis-regulation allow to draw a model for the definition of r3/r4 border position. The position of the border is precisely localized where the initiation level exceeds the activation threshold of element A (Fig. 7B). Anterior to this border, *krox20* level increases due to autoregulation: all cells commit to the *krox20*-positive fate. Concomitantly or shortly after, the activity of C is reinforced due to indirect *krox20* autoregulation through element C (Fig. 7C). This territory defines r3. In case of FGF loss of function, the overall activity of C is decreased according to a rheostat effect, hence reduced level of initiated *krox20* (Fig. 7D). The r3/r4 border is shifted accordingly towards the anterior pole while the r2/r3 border remains unaffected because the pattern of element C activity is straight (Fig. 7E). This is consistent with our quantification of border positions showing that the r2/r3 boundary does not move in case of FGF knockdown. The same conclusions apply when FGF signaling is upregulated by use of *Sprouty4* morpholinos: the r2/r3 border is unaffected and the r3/r4 is shifted posteriorly. Consistently, we showed in a previous study that the supernumerary *krox20*-positive cells exclusively expands at the expense of r4 (Labalette et al., 2011).

According to this model, the patterning effect of FGF signaling in the r3-r4 region is indirect, acting as a rheostat on a regionalized element C domain through modulation of Sp5l activity, hence oriented shifts in border positions. This mode of action cannot be defined as morphogenetic *per se* because the positional information primarily comes from the asymmetric pattern of C activity and not the gradient of FGF ligands.

REFERENCES

- Aragon, F. and Pujades, C.** (2009). FGF signaling controls caudal hindbrain specification through Ras-ERK1/2 pathway. *BMC developmental biology*, **9**, 61.
- Chomette, D., Frain, M., Cereghini, S., Charnay, Patrick, and Ghislain, J.** (2006). Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 1253–62.
- Labalette, C., Bouchouca, Y. X., Wassef, M. A., Gongal, P. A., Le Men, J., Becker, T., Gilardi-Hebenstreit, P., and Charnay, Patrick** (2011). Hindbrain patterning requires fine-tuning of early krox20 transcription by Sprouty 4. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 317–26.
- Marín, F. and Charnay, P** (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 4925–35.
- Maves, L., Jackman, W., and Kimmel, C. B.** (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 3825–37.
- Raible, F. and Brand, M.** (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mechanisms of development*, **107**, 105–17.
- Roehl, H. and Nüsslein-Volhard, C.** (2001). Zebrafish pea3 and erm are general targets of FGF8 signaling. *Current biology : CB*, **11**, 503–7.
- Sun, Z., Zhao, J., Zhang, Y., and Meng, A.** (2006). Sp51 is a mediator of Fgf signals in anteroposterior patterning of the neuroectoderm in zebrafish embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**, 2999–3006.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I. M., Dickson, C., and Mason, I.** (2002). Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Current biology : CB*, **12**, 1117–23.
- Wang, M., Bao, Y.-L., Wu, Y., Yu, C.-L., Meng, X.-Y., Huang, Y.-X., Sun, Y., Zheng, L.-H., and Li, Y.-X.** (2010). Basic FGF downregulates TSP50 expression via the ERK/Sp1 pathway. *Journal of cellular biochemistry*, **111**, 75–81.
- Wassef, M. a, Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, Patrick, and Ghislain, J.** (2008). Rostral hindbrain patterning involves the direct activation of a Krox20 transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis factors. *Development (Cambridge, England)*, **135**, 3369–78.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A.** (1993). The Ets family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS*, **211**, 7–18.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2004). Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **229**, 393–9.
- Zhao, J., Cao, Y., Zhao, C., Postlethwait, J., and Meng, A.** (2003). An SP1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *The EMBO journal*, **22**, 6078–88.

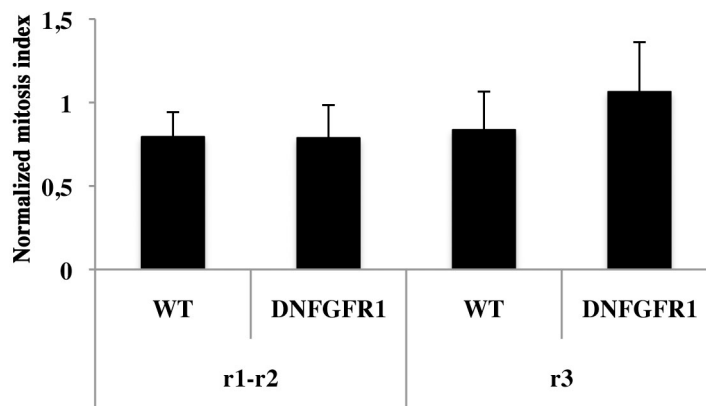


Figure S1. Cell proliferation is unchanged in embryos where FGF signaling is downregulated.

Mitosis index in DNFGFR1 transgenic embryos. Fluorescent *krox20* in situ hybridization was followed by phospho-histone3 (PH3) immunostaining. Embryos were then flat-mounted and observed under confocal microscopy. 12 sections of 1.7 μm per embryo were analyzed by counting the number of PH3 positive cells in each rhombomere normalized by its size. Student t-test was performed and reveals no significant differences between *DNFGFR1* (n=22) and WT siblings (n=16).

IV. Analyse du mutant murin *Krox20*^{ΔC}

La dernière approche entreprise lors de mes travaux de thèse pour caractériser l'élément C a été l'analyse des mutants murins au sein desquels l'élément C a été excisé. Engagée initialement avec l'objectif de confirmer l'importance fonctionnelle de cet élément dans la régulation de *Krox20* mise en évidence par les expériences présentées dans les parties précédentes, cette étude s'est révélée riche en surprises. Elle met en évidence trois propriétés nouvelles et essentielles du contrôle transcriptionnel de *Krox20* :

- l'existence d'au moins un élément régulateur supplémentaire impliqué dans le démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 mais insuffisant au maintien de cette expression.
- la coopération en *cis* entre l'élément autorégulateur A et l'élément initiateur C nécessaire au fonctionnement de la boucle d'autorégulation.
- le fait qu'un pulse restreint d'expression de *Krox20* dans r3, tronqué à 6 ss, est suffisant au déclenchement et au maintien de l'expression de sa cible *Epha4* et à la mise en place du rhombomère 3, bien que légèrement plus petit.

IV.1. Stratégie d'excision de l'élément C

L'excision de l'élément C du génome murin a reposé sur l'insertion de part et d'autre de l'élément de sites de recombinaison LoxP (Figure 49.A, allèle *Krox20*^{Cl^{ox}}). Cette introduction, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires, a été réalisée par l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) selon une stratégie présentée en Figure 49A. Pour exciser effectivement l'élément C et générer les souris *Krox20*^{ΔC} (figures 49.A et 49.C), j'ai croisé les souris *Krox20*^{Cl^{ox}} avec une lignée exprimant de façon ubiquitaire la protéine recombinante *Cre*.

La stratégie d'excision de l'élément C a été élaborée il y a plusieurs années, peu après la découverte de cet élément et avant que mes travaux n'en redéfinissent les

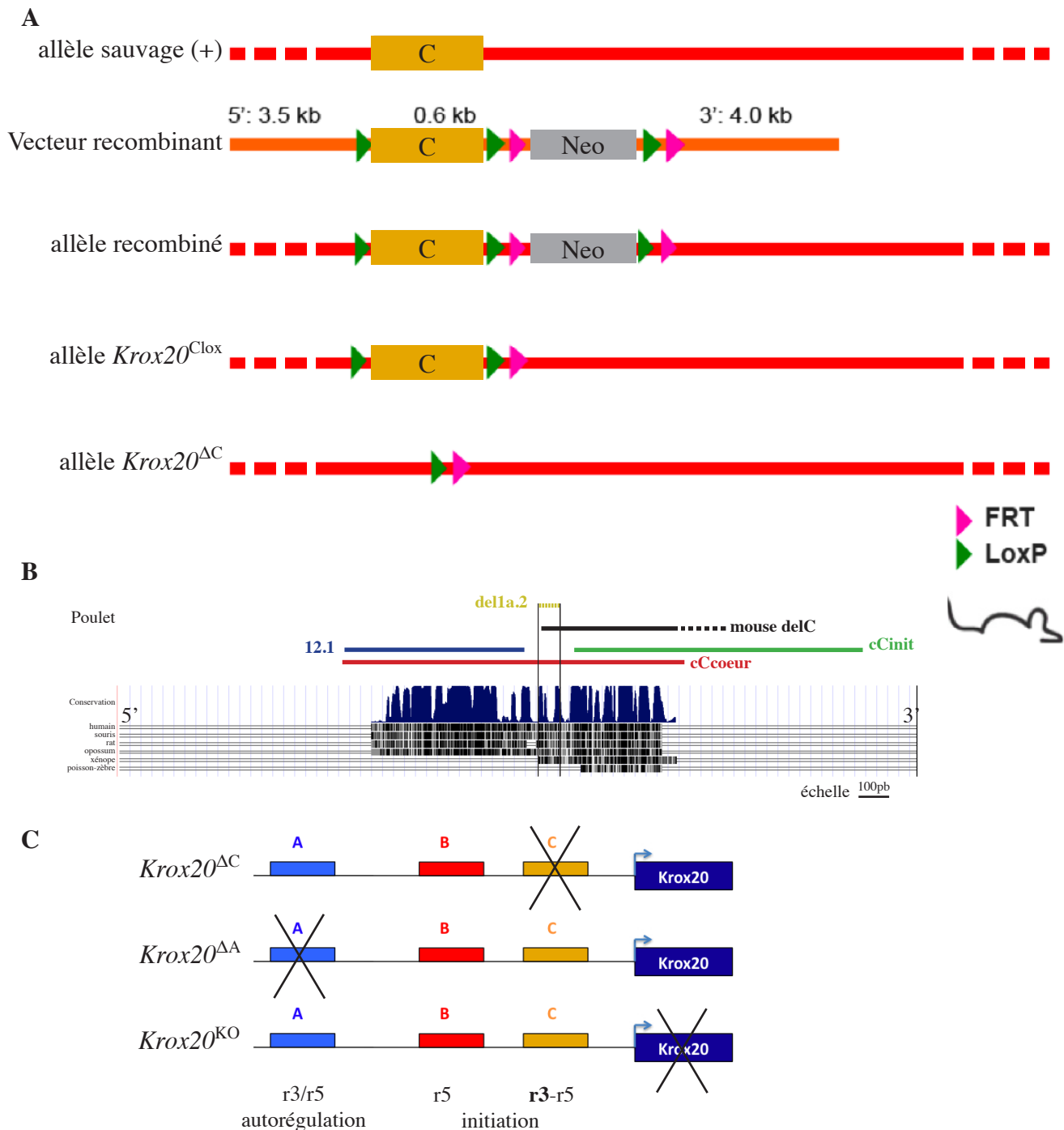


Figure 49. Excision de l'élément C du génome murin

A: Stratégie d'excision de l'élément C. L'élément C a été excisé par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris avec le vecteur recombinant montré comprenant l'élément C flanqué de deux sites Lox et le gène de la néomycine flanqué de deux sites de recombinaison FRT. La longueur des bras recombinants de chaque côté du vecteur est indiquée. Le gène de la néomycine a permis la sélection des clones cellulaires recombinés et a ensuite été éliminé du génome par croisement des souris issues de ces clones avec une lignée *ATCB-FLP* exprimant la protéine Flippase de façon ubiquitaire (protéine recombinant les sites FRT). Les souris *Krox20*^{Clox} ainsi générées ont ensuite été croisées avec une lignée *PGK-Cre* exprimant la protéine Cre de façon ubiquitaire pour produire les animaux *Krox20*^{ΔC}. Schéma communiqué par l'Institut Clinique de la Souris. La représentation n'est pas à l'échelle.

B: Représentation graphique montrant le profil de conservation des séquences autour de l'élément C. Au dessus sont représentées les séquences mentionnées dans le texte ainsi que la région excisée dans les animaux *Krox20*^{ΔC}. La partie la plus en 3' est hachurée puisqu'elle recouvre une portion non conservée entre les génomes murin et aviaire.

C: Schéma des différents allèles utilisés dans ce chapitre. La taille des locus et les distances ne sont pas à l'échelle.

frontières. Elle visait à éliminer du génome murin une séquence de 600 pb centrée sur la partie conservée de Cinit, d'environ 300 pb (figure 49.B), et ne comprend donc pas l'intégralité de l'élément Ccœur redéfini. Toutefois, elle regroupe les régions les mieux conservées de l'élément Ccœur et surtout elle inclut la séquence del1a.2 qui est la seule région dont l'ablation modifie le comportement transcriptionnel de Ccœur (voir partie I). De plus, l'activité transcriptionnelle de la séquence 12.1, qui couvre la quasi totalité de la partie de l'élément Ccœur non incluse dans la région excisée des souris *Krox20^{ΔC}* (figure 49.B), a été testée par électroporation chez le poulet et transgénèse chez la souris et n'induit aucune expression (Chomette et al., 2006). Il est donc fortement probable que les souris *Krox20^{ΔC}* aient perdu toute activité transcriptionnelle liée à l'élément C.

IV.2. *Krox20* commence à s'exprimer mais ne se maintient pas dans r3 chez les souris *Krox20^{ΔC}*

Les mutants murins homozygotes *Krox20^{ΔC/ΔC}* sont viables et fertiles et les souris semblent se développer normalement.

La cinétique d'expression de *Krox20* chez ces animaux a été analysée par hybridation *in situ* (figures 50.A-G'). Les souris hétérozygotes *Krox20^{ΔC/+}* (figure 50.A-G) et les souris sauvages (non montrées) présentent des dynamiques d'expression de *Krox20* similaires, en cohérence avec le fait que l'expression de *Krox20* est normale chez le mutant hétérozygote *Krox20^{KO/+}* (Schneider-Maunoury et al., 1993).

Chez les mutants homozygotes *Krox20^{ΔC/ΔC}*, l'expression de *Krox20* démarre normalement dans r3 puis r5 et s'étend de la même façon que chez les animaux hétérozygotes jusqu'au stade 4-5 ss (figures 50.A-B'). En revanche, à partir du stade 6 ss, l'expression de *Krox20* faiblit dans r3 et disparaît progressivement jusqu'à ne plus être détectable que sous forme de rares foci de faible intensité (figures 50.C-G'). L'expression dans r5 est normale ou seulement faiblement affectée dans les stades précoces (figure 50.D'), confirmant que l'élément C ne joue qu'un rôle limité dans ce rhombomère et que l'élément B y est bien le principal élément initiateur de *Krox20*. Cela suggère également que le locus *Krox20* sur l'allèle *Krox20^{ΔC}* produit une protéine fonctionnelle, notamment

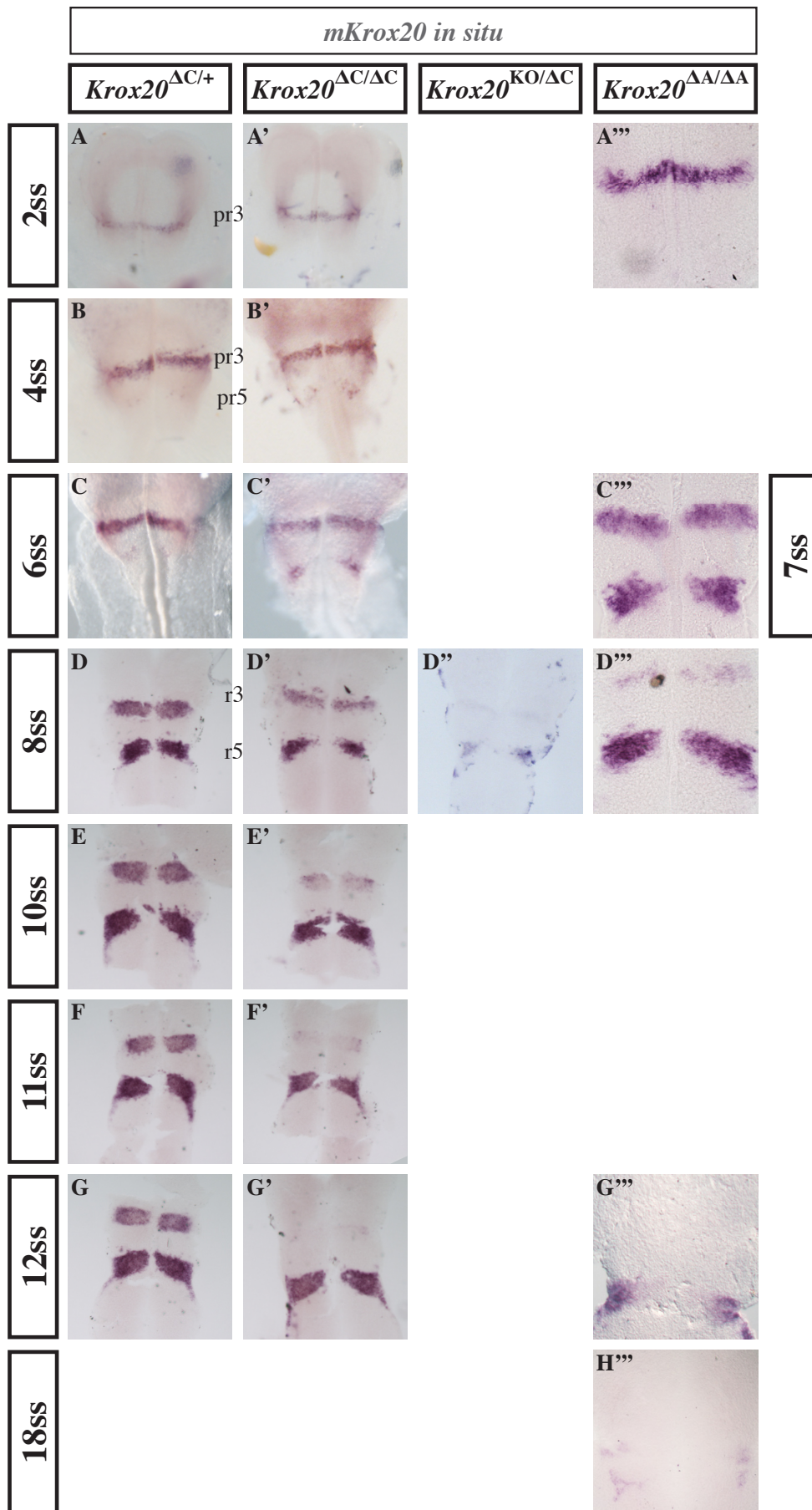


Figure 50. L'expression de *Krox20* démarre normalement dans les mutants murins *Krox20*^{ΔC/ΔC} mais n'est pas maintenue

Cinétique d'expression de *Krox20* suivie par hybridation in situ dans les animaux contrôles *Krox20*^{ΔC/+} (A-G) et les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC} (A'-G'), *Krox20*^{KO/ΔC} (D'') et *Krox20*^{ΔA/ΔA} (A'''-H'''). Les embryons sont montés à plat à l'exception de A-C'. pr : pré-rhombomère, r : rhombomère.

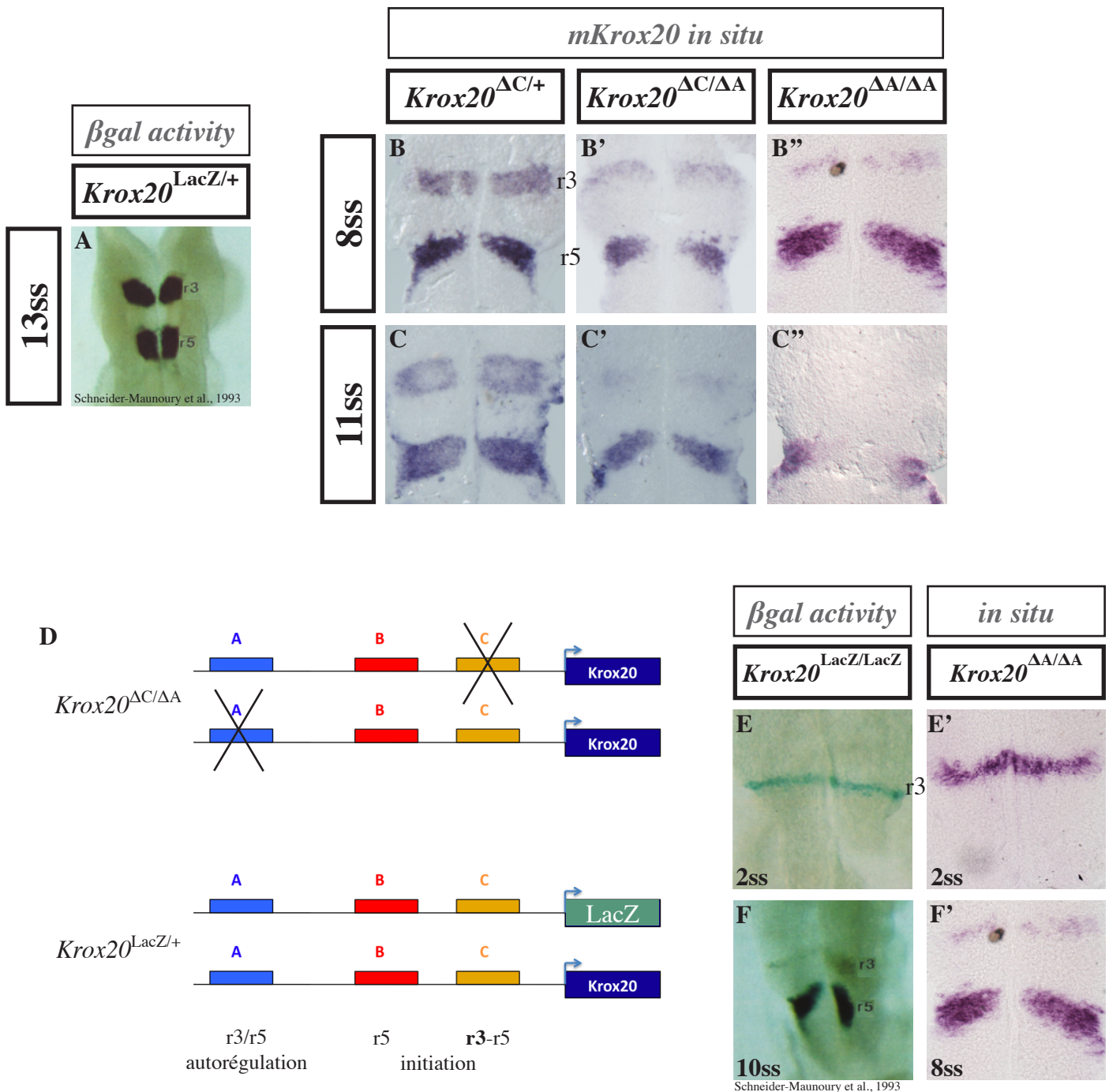
capable de s'autoréguler dans r5, et qu'il n'a pas été accidentellement modifié lors de la manipulation génétique ayant mené à l'excision de l'élément C.

Ces résultats sont surprenants à deux titres : d'une part, ils montrent qu'il existe un autre élément régulateur impliqué dans le démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 puisque celui-ci est normal chez les souris *Krox20^{ΔC/ΔC}*. La nature de cet élément initiateur supplémentaire et les pistes pour le rechercher font l'objet de plusieurs paragraphes dans la discussion de ce manuscrit.

D'autre part, le phénotype de non maintien d'expression chez les mutants *Krox20^{ΔC/ΔC}* est inattendu puisque cette fonction est normalement assurée par l'élément autorégulateur A. En effet, comme énoncé dans le chapitre précédent, de récents travaux réalisés par Yassine Bouchoucha ont montré que la forte production transcriptionnelle induite par l'élément A faisait de lui un interrupteur moléculaire, engageant les cellules ayant déclenché son activité vers un destin '*Krox20* positif', c'est-à-dire de maintien de l'expression de *Krox20* (Bouchoucha et al., en préparation). Or, le suivi de l'activité de l'élément A par révélation de l'activité βgalactosidase dans des souris portant le transgène A:βgal (Chomette et al., 2006) suggère que celui-ci commence à être actif bien avant le stade 6 ss. En théorie, l'expression de *Krox20* chez les souris *Krox20^{ΔC/ΔC}* persiste donc suffisamment longtemps et devrait activer l'élément A. Néanmoins, la très forte similitude des phénotypes d'expression de *Krox20* dans r3 des animaux *Krox20^{ΔC/ΔC}* et *Krox20^{ΔA/ΔA}* (données de Yassine Bouchoucha, figures 50.A'''-H''') nous a mené à poser l'hypothèse que l'élément A est non fonctionnel dans r3 chez les souris *Krox20^{ΔC/ΔC}*.

IV.3. Les éléments C et A coopèrent en *cis* pour assurer le maintien de l'expression de *Krox20*

Le niveau d'expression de *Krox20* dans les phases initiales chez le mutant *Krox20^{ΔC/ΔC}* semble similaire à celui des hétérozygotes *Krox20^{ΔC/+}*, bien que l'hybridation *in situ* ne permette pas une approche rigoureusement quantitative. Il semble donc que l'inactivité de l'élément A dans le mutant *Krox20^{ΔC/ΔC}* ne soit pas due à une quantité insuffisante de transcrits produits pour le déclencher.



Une autre possibilité pour expliquer l'inactivité apparente de l'élément A est que la présence physique de l'élément C puisse être nécessaire à son fonctionnement en *cis*, par exemple au travers d'une interaction physique de type boucle chromosomique. Afin de tester cette hypothèse, j'ai croisé les souris $Krox20^{\Delta C}$ et $Krox20^{\Delta A}$ afin de générer des mutants composés $Krox20^{\Delta C/\Delta A}$ où l'élément C est excisé sur un allèle et l'élément A sur l'autre (figure 51.D).

Chez ces animaux, l'expression dans r3 n'est pas maintenue, similairement à ce qui est observé avec les mutants $Krox20^{\Delta A/\Delta A}$ (figures 51.B'-C'') ou $Krox20^{\Delta C/\Delta C}$. Cela suggère que l'élément A situé sur l'allèle $Krox20^{\Delta C}$ n'est plus capable de maintenir l'expression de $Krox20$ en absence de l'élément C. Il pourrait être argué qu'exciser une copie de l'élément C et de l'élément A du génome murin ne permet plus la production d'un nombre suffisant de transcrits par les éléments régulateurs restants pour maintenir l'expression de $Krox20$. Le phénotype du mutant hétérozygote $Krox20^{lacZ/+}$ permet d'écarter cette hypothèse. En effet, chez ces souris l'expression de $Krox20$ est maintenue (figure 51.A, Schneider-Maunoury et al., 1993)* bien qu'elle ne soit assurée que par un seul allèle (51.D), ce qui équivaut à la déplétion sur l'allèle muté de l'ensemble des éléments régulateurs de $Krox20$, incluant A et C. La différence entre ces deux mutants réside donc dans la localisation des éléments A et C l'un par rapport à l'autre : dans le cas de l'hétérozygote $Krox20^{KO/+}$, les éléments A et C sont situés sur le même allèle tandis

* : en réalité, dans l'étude (Schneider-Maunoury et al., 1993), ce n'est pas l'expression de $Krox20$ sur l'allèle $Krox20^+$ qui a été suivie par hybridation *in situ* mais celle de l'allèle $Krox20^{lacZ}$ par révélation de l'activité β -galactosidase. La quantité de transcrits LacZ produits est cependant identique puisque le gène $LacZ$ a été inséré au locus $Krox20$ et est donc sous la dépendance des mêmes éléments régulateurs, c'est-à-dire, dans r3, l'élément C, l'élément initiateur additionnel et l'élément autorégulateur A dont l'activité est dépendante de la protéine $Krox20$ produite à partir du seul autre allèle. Il est possible que l'activité β -galactosidase soit plus stable que le transcrit $Krox20$ et retarde la détection d'une éventuelle chute d'expression de $Krox20$. La cinétique d'activité β -galactosidase chez l'homozygote $Krox20^{lacZ/lacZ}$ comparée à celle de l'expression de $Krox20$ chez le mutant $Krox20^{\Delta A/\Delta A}$ suggère que ce retard dans le temps n'est que d'environ 2 ss (figures 51.E-F') et ne modifie donc pas nos interprétations puisque l'activité β -galactosidase est détectée fortement dans r3 jusque 9,5 jpc chez les animaux $Krox20^{lacZ/+}$ (Schneider-Maunoury et al., 1993). Des expériences sont néanmoins en cours pour suivre directement l'expression de $Krox20$ par hybridation *in situ* chez les souris hétérozygotes $Krox20^{lacZ/+}$.

qu'ils se trouvent sur des allèles différents chez le mutant composé $Krox20^{AC/\Delta A}$. Le non maintien de l'expression de $Krox20$ dans ce deuxième cas montre que l'élément C et l'élément A coopèrent en *cis* pour assurer cette fonction de maintien.

L'expression de $Krox20$ dans r5 n'est pas modifiée et est cohérente avec le fait que l'élément C y joue un rôle secondaire. Elle constitue un contrôle interne opportun dans les mutants $Krox20^{AC/\Delta A}$. Elle montre également que dans r5, l'élément A ne requiert pas la présence physique de l'élément C pour être actif, suggérant qu'il peut l'être seul ou que l'élément B, ou un autre élément régulateur inconnu, coopère avec l'élément A dans r5.

IV.4. Le territoire d'expression du gène cible *EphA4* dans r3 est réduit relativement à r4

La cinétique d'expression du gène *EphA4*, cible directe de $Krox20$, a été suivie par hybridation *in situ* afin d'étudier les conséquences dans le rhombencéphale du non maintien de l'expression de $Krox20$ dans r3 chez le mutant $Krox20^{AC/\Delta C}$ (figure 52.A-D'). Dès le stade 6 ss, le territoire d'expression d'*EphA4* dans r3 apparaît réduit au niveau AP, relativement à r4 (figures 52.A et A'), et cette réduction relative se retrouve dans tous les stades ultérieurs (figures 52.B-D'') selon un pourcentage de diminution oscillant entre 15 et 40%. Cela suggère qu'une partie des cellules destinées à former le rhombomère 3 a été reprogrammée en cellules de r4 chez le mutant $Krox20^{AC/\Delta C}$ ou a disparu après l'engagement d'un processus d'apoptose.

Ainsi, l'extinction précoce de $Krox20$ chez les souris $Krox20^{AC/\Delta C}$ entraîne la formation d'un rhombomère 3 plus petit, caractérisé par un territoire d'expression moins étendu pour *EphA4*. En revanche, l'expression d'*EphA4* dans r3 est maintenue jusqu'au stade 15 ss, suggérant qu'un pulse de $Krox20$ jusqu'au stade 6 ss est suffisant pour engager un nombre significatif de cellules à adopter une identité r3 et mettre en place ce rhombomère.

De façon cohérente avec le maintien de l'expression de $Krox20$ dans r5, l'expression d'*EphA4* dans ce rhombomère chez le mutant $Krox20^{AC/\Delta C}$ n'est que faiblement affectée (figures 52.A-D').

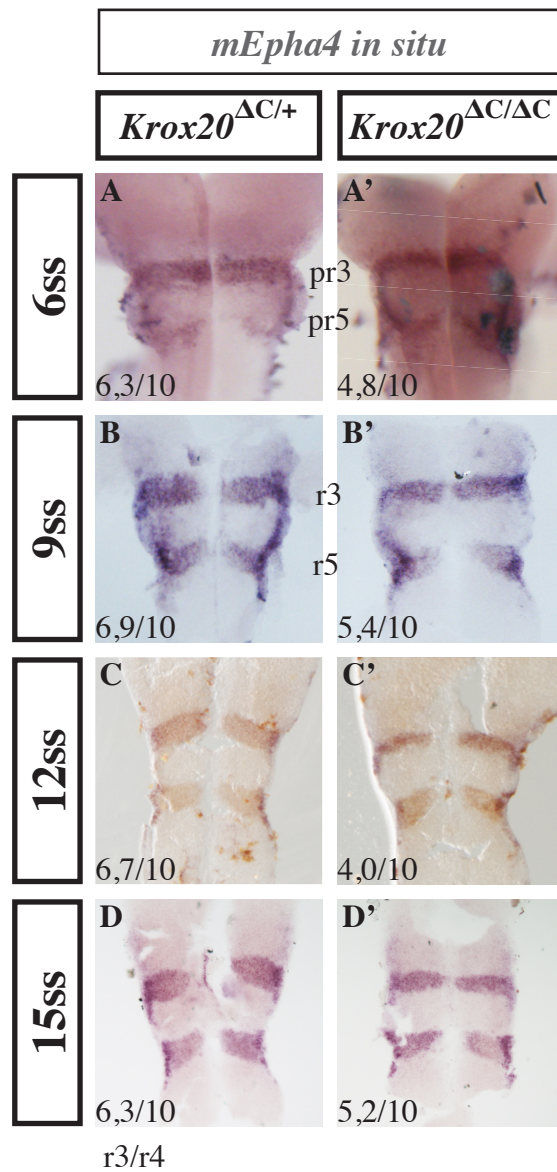


Figure 52. **Le territoire d'expression d'*Epha4* dans r3 est réduit relativement à r4**

Cinétique d'expression d'*Epha4* suivie par hybridation in situ dans les animaux contrôles *Krox20*^{ΔC/+} (**A-D**) et les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC} (**A'-D'**). Les embryons sont montés à plat à l'exception de A et A'.

pr : pré-rhombomère, r : rhombomère. Les nombres en bas à gauche des cadres représentent le ratio des tailles de r3 et de r4 mesurées sur les photographies.

IV.5. Le phénotype d'expression de *Krox20* est aggravé chez les mutants *Krox20*^{KO/ΔC}

Afin de mieux caractériser le mode d'action des différents éléments régulateurs de *Krox20*, l'expression de ce dernier a été suivie dans des mutants *Krox20*^{KO/ΔC} (figure 50.D"). Le phénotype de non maintien de l'expression de *Krox20* dans r3 est accentué et surtout l'expression dans r5 est plus affectée par comparaison avec les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC}. Le remplacement de l'allèle *Krox20*^{ΔC} par un allèle *Krox20*^{KO} affaiblit donc le niveau d'expression détecté dans r3 et r5, ce qui suggère plusieurs interprétations quand aux fonctionnements des différents éléments régulateurs discutées plus bas. De plus, il montre également que l'élément C en trans, présent sur l'allèle *Krox20*^{KO}, n'est pas capable de restaurer l'expression de *Krox20* ou l'activité de l'élément A situé sur l'allèle *Krox20*^{ΔC}.

IV.6. Commentaires

L'analyse entreprise dans ce chapitre sur le mutant murin *Krox20*^{ΔC/ΔC} remet en question le modèle de contrôle transcriptionnel de *Krox20* décrit jusqu'ici et proposant que les éléments B et C sont responsables des phases initiales de l'expression de *Krox20*, dans r5 et r3 respectivement, tandis que l'élément A, déclenché lorsque le niveau de transcrits *Krox20* dépasse un certain seuil, assure l'amplification et le maintien de celle-ci dans r3 et r5 à travers une boucle d'autorégulation. En effet, les résultats montrent qu'un élément régulateur supplémentaire intervient dans le démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 et que l'élément C est également impliqué dans le mécanisme d'autorégulation de *Krox20* à travers la coopération en *cis* avec l'élément A. Les travaux décrits ne font que défricher ces phénomènes et leur caractérisation complète nécessitera la réalisation de nombreuses expériences supplémentaires. Une partie de celles-ci, liée directement aux résultats, est proposée dans cet opus. D'autres suggestions visant des perspectives plus larges sont discutées dans la partie idoine de ce manuscrit en même temps que des considérations générales sur le rôle de l'élément C.

IV.6. a) Le niveau initial de *Krox20* dans les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC} est normal et devrait être suffisant pour déclencher l'élément A

La similarité des profils d'expression de *Krox20* jusqu'au stade 6 ss des mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC} et des animaux sauvages nous a amené à considérer que le niveau de transcrits *Krox20* dans ces animaux était identique, ou tout au moins suffisant pour enclencher l'activité de l'élément A, entraînant que l'incapacité de celui-ci à maintenir une expression normale de *Krox20* résultait d'une autre cause. Toutefois l'hybridation *in situ* ne permet qu'un aperçu grossier de la concentration cellulaire en transcrits. Si les expériences réalisées avec le mutant composé *Krox20*^{ΔC/ΔA} semblent confirmer que le phénotype observé s'explique indépendamment du niveau d'expression initial de *Krox20*, la mesure précise de la quantité de transcrits *Krox20* dans r3 au sein d'animaux *Krox20*^{ΔC/ΔC} et sauvages, par RT-PCR-quantitative après extraction des ARNs, permettrait de s'en assurer complètement.

Une autre approche, indirecte, consisterait à croiser les souris transgéniques A:lacZ et *Krox20*^{ΔC/ΔC} afin de vérifier que le niveau d'expression de *Krox20* dans ces dernières est suffisant pour activer l'élément A dans un contexte transgénique. Bien qu'un résultat positif conforterait nos conclusions, il ne suffirait pas à les valider puisque les contraintes sur l'élément A transgénique sont nécessairement différentes que dans un contexte endogène, la preuve étant que, contrairement au A endogène, l'élément A transgénique est actif en l'absence de l'élément C en *cis*.

IV.6. b) L'élément A est inactif sur l'allèle *Krox20*^{ΔC}

Le non maintien de l'expression de *Krox20* chez les souris *Krox20*^{ΔC/ΔC} et le mutant composé *Krox20*^{ΔC/ΔA} suggère que l'élément A situé sur l'allèle *Krox20*^{ΔC} est inactif puisqu'incapable d'assurer la production de transcrits *Krox20* malgré un niveau initial identique, sous réserve des vérifications proposées dans le paragraphe précédent. L'exploitation d'une lignée murine présentant un polymorphisme dans la séquence génétique de *Krox20* (*Krox20*^{CAST}) devrait apporter une preuve directe de ce phénomène. En effet, la génération d'animaux *Krox20*^{CAST/ΔC} permet de différencier, par RT-PCR puis séquençage, les transcrits produits par l'allèle sauvage *Krox20*^{CAST} de ceux produits par *Krox20*^{ΔC} dont la quantité dans r3 devrait être négligeable à partir du stade 10 ss.

Une autre démarche visant à montrer que l'élément A requiert la présence physique en *cis* de l'élément C pour être fonctionnel consisterait à croiser des souris *Krox20^{Cre}* et *Krox20^{Clox}*. En effet, dans ces souris, la phase initiale d'expression de *Krox20* est assurée normalement puisque l'élément C est intègre sur l'allèle *Krox20^{Clox}* (sous réserve que l'insertion des deux sites LoxP et du site FRT résiduel au niveau de l'élément C ne modifie pas son activité^{1*}). Parallèlement, les éléments initiateurs situés sur l'allèle *Krox20^{Cre}*, où le gène de la protéine recombinante Cre est inséré en lieu et place du locus *Krox20*, vont induire la production de cette dernière. L'accumulation de celle-ci va entraîner l'excision de l'élément C sur l'allèle *Krox20^{Clox}* dans un nombre croissant de cellules de r3 et de r5. Si les souris *Krox20^{Clox/Cre}* montrent une extinction précoce de *Krox20* dans r3, cela confirmera la dépendance de l'élément A à la présence physique de l'élément C pendant la phase d'autorégulation, indépendamment de la présence de l'élément C pendant la phase d'initiation.

IV.6. c) Un pulse initial de *Krox20* suffit à l'établissement de l'expression d'*EphA4* dans un r3 plus petit

L'étude de l'expression d'*EphA4*, cible directe de *Krox20*, a permis deux observations. La première est que son domaine d'activation, et par extension r3, est réduit, ce qui est cohérent avec l'extinction précoce de *Krox20* dans ce rhombomère. Il serait intéressant de déterminer si les cellules normalement destinées à former r3 acquièrent des identités de type r2 ou r4 ou meurent par apoptose. L'utilisation de la lignée r2-AP, au sein de laquelle le gène de la phosphatase alcaline est sous le contrôle de l'élément régulateur activant l'expression de *Hoxa2* dans r2 (Tümpel et al., 2008), combinée à une hybridation *in situ* contre *EphA4* (r3/r5), contre *Hoxb1* (r4) et contre un marqueur dont le territoire n'est pas affecté dans le mutant *Krox20^{ΔC/ΔC}*, tel que *Fgf8* dans la MHB, permettrait de mesurer la taille de r2, r3 et r4 rapportée à celle du

* Ce point n'est pas anodin et nécessite d'être vérifié en suivant l'expression de *Krox20* au sein de souris homozygotes *Krox20^{Clox/Clox}*. En effet, puisque l'excision de l'élément C n'est que partielle sur l'allèle *Krox20^{ΔC}*, cela signifie qu'un des deux sites LoxP se situe au sein des séquences constituant l'élément C, au niveau de la région del2. Si les résultats de la partie I suggèrent que ces séquences sont secondaires pour l'activité transcriptionnelle de l'élément C, rien n'indique qu'elles ne jouent pas un rôle important pour la coopération avec l'élément A.

domaine *Fgf8* et de déterminer si r2 et/ou r4 sont plus grands, indiquant une reconversion des cellules normalement incluses dans r3, et si le territoire r2/r3/r4 est globalement plus petit, suggérant que des cellules ont été perdues.

Bien que cela nécessite d'être confirmé, il semble que le territoire *EphA4*/r3 est plus réduit dans le mutant *Krox20*^{ΔA/ΔA} que chez les souris *Krox20*^{ΔC/ΔC} (données non montrées). Cette différence pourrait traduire la persistance d'une certaine activité réduite de l'élément A chez le mutant *Krox20*^{ΔC/ΔC}. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'extinction de *Krox20* dans r3 semble plus rapide chez le mutant *Krox20*^{ΔA/ΔA} (comparer figures 50.D' et D'''). Cette extinction semble également commencer légèrement plus tard, l'expression de *Krox20* étant encore assez forte dans r3 à 7 ss chez le mutant *Krox20*^{ΔA/ΔA} alors qu'elle a déjà commencé à décroître à 6 ss dans les souris *Krox20*^{ΔC/ΔC} (comparer figures 50.C''' avec C'). Nous reviendrons sur ce point dans la discussion de ce manuscrit.

Le deuxième observation est que, chez le mutant *Krox20*^{ΔC/ΔC} (figure 52.D') aussi bien que chez le mutant *Krox20*^{ΔA/ΔA} (non montré), l'expression d'*EphA4* semble se maintenir tardivement dans r3, au moins jusqu'au stade 15-16 ss, malgré la disparition précoce de *Krox20* dans ce rhombomère engagée à partir de 5-6 ss. Cela suggère que *Krox20* n'est nécessaire que pendant la phase de démarrage de l'expression d'*EphA4* et qu'un pulse temporellement restreint de *Krox20* suffit à mettre en place r3 et à enclencher le programme de développement qui lui est associé. Ces résultats sont cohérents avec des travaux non publiés réalisés il y a plusieurs années par le laboratoire en croisant des animaux *Krox20*^{Cre} avec une lignée *Krox20*^{lox} où deux sites loxP flanquent le locus *Krox20*. Dans ces mutants *Krox20*^{Cre/lox}, l'expression d'*EphA4* est maintenue dans r3 et r5 au moins jusqu'à 15 ss malgré l'extinction précoce de *Krox20* vers 5-6 ss. L'absence de phénotype visible des mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC}, en terme de viabilité ou de comportement, conforte l'hypothèse que le développement de r3 n'est pas ou peu perturbé bien qu'une observation méthodique des animaux après la naissance ainsi que de l'organisation neuronale dans r3 est nécessaire pour la vérifier.

IV.6. d) Interprétations du phénotype du mutant *Krox20*^{KO/ΔC}

L'expression de *Krox20* dans le mutant *Krox20*^{KO/ΔC} est plus affectée, à la fois dans r3 et dans r5, que le chez mutant *Krox20*^{ΔC/ΔC} à 8 ss. Ce résultat permet plusieurs interprétations.

La plus simple d'entre elles consiste à considérer que l'élément A présente effectivement une faible activité résiduelle sur l'allèle *Krox20*^{ΔC}. Le remplacement de cet allèle par l'allèle *Krox20*^{KO} dans le mutant *Krox20*^{KO/ΔC} divise par deux l'activité résiduelle observée du A dans ce mutant, d'où une extinction plus brutale.

Une autre possibilité, n'excluant pas nécessairement la première, est que le niveau de transcrits *Krox20* observés dans les animaux *Krox20*^{KO/ΔC} à 8 ss ne traduit pas une extinction plus rapide mais un niveau initial moins important. Cette production initiale est induite dans r3 uniquement par l'élément régulateur additionnel non identifié (que l'on nommera désormais C2) puisque l'élément C est soit excisé soit associé à un locus *Krox20* non fonctionnel (figure 53). Or, l'élément C2 est présent en deux copies fonctionnelles chez le mutant *Krox20*^{ΔC/ΔC} (figure 53.B) tandis que l'expression de *Krox20* chez les animaux *Krox20*^{KO/ΔC} n'est assurée que par une seule copie de C2 (figure 53.C). Cela mettrait donc en évidence un effet dose de l'élément C2. Cet effet dose serait révélé par l'excision de l'élément C puisqu'il n'est pas observé dans l'hétérozygote *Krox20*^{LacZ/+} où la production initiale de LacZ dans r3 est assurée par une copie de C et une copie de C2 (figure 53.A). Le suivi de l'expression de *Krox20* chez le mutant *Krox20*^{KO/ΔC} à des stades précoces permettrait de confirmer ou d'infirmer cette théorie.

Le niveau d'expression de *Krox20* dans r5 dans le mutant *Krox20*^{KO/ΔC}, réduit par rapport au mutant *Krox20*^{ΔC/ΔC}, peut s'interpréter comme précédemment en remplaçant l'élément C2 par l'élément B. Il suggère que l'élément C est impliqué, bien que de façon limitée, dans l'induction transcriptionnelle de *Krox20* dans r5 et qu'en son absence, un effet dose de l'élément B sur le niveau de transcrits *Krox20* dans r5 devient détectable.

La conjonction des phénotypes dans r3 et r5 est un élément en faveur de cette seconde hypothèse et de l'implication de C dans les phases initiales d'expression de *Krox20* dans r3 comme dans r5, de façon plus secondaire.

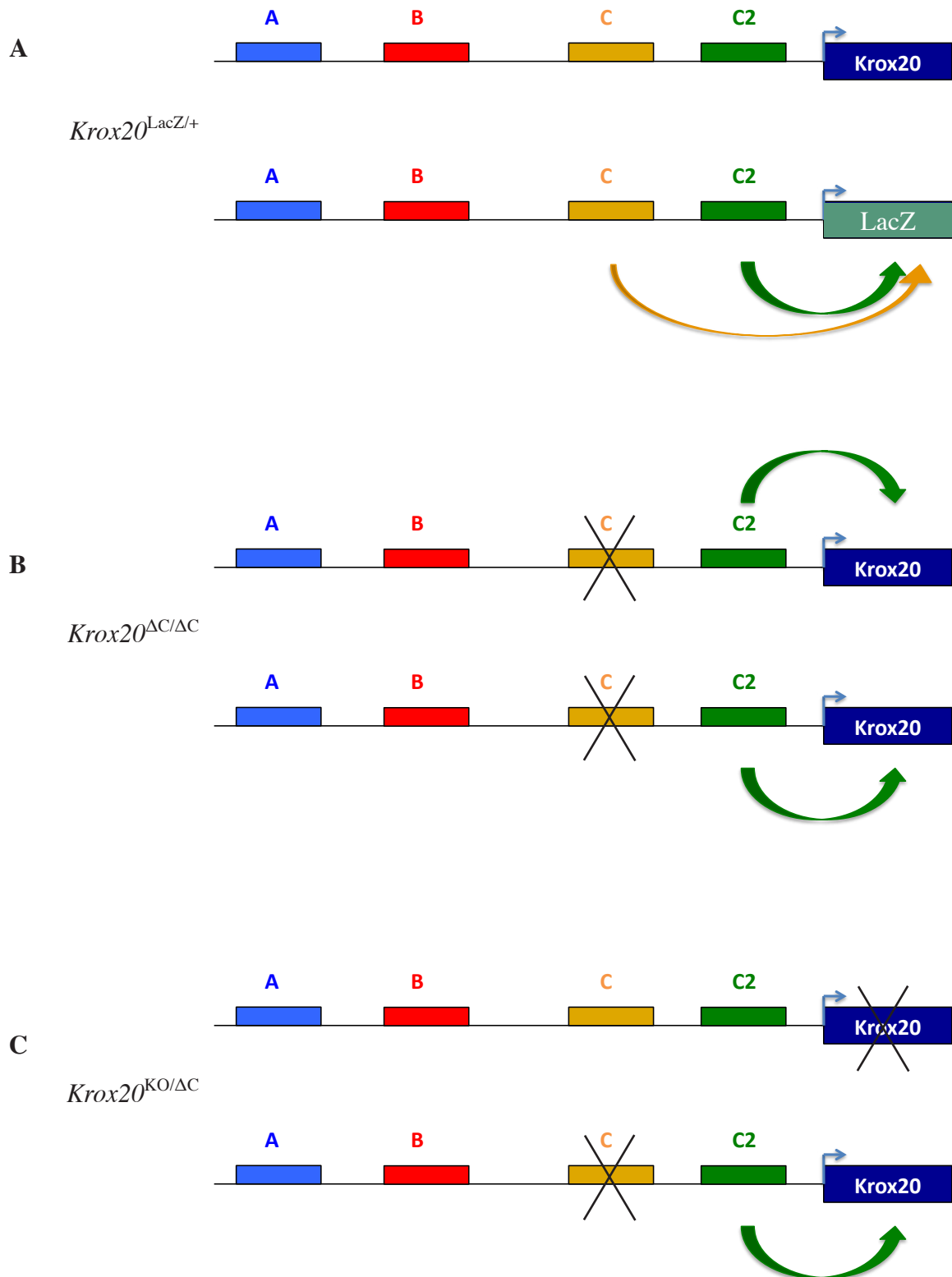


Figure 53. Schéma des éléments régulateurs impliqués dans la production initiale de transcrits *Krox20* dans r3 selon les croisements réalisés

Pour l'hétérozygote *Krox20^{LacZ/+}*, ce sont les éléments régulateurs impliqués dans la production du transcrit *LacZ* qui sont indiqués puisque l'expression de *Krox20* a été suivie, indirectement, par révélation de l'activité β -galactosidase.

DISCUSSION

La régulation transcriptionnelle du gène *Krox20* dans le rhombencéphale constitue un modèle pour comprendre les mécanismes régissant le contrôle transcriptionnel aussi bien sur le plan moléculaire qu'à l'échelle du tissu, ainsi que l'interdépendance entre ces deux niveaux. En effet, en accord avec sa fonction centrale dans la segmentation morphologique et identitaire du rhombencéphale, l'expression de *Krox20* est finement contrôlée dans le temps et dans l'espace par des acteurs multiples intervenant sur différentes phases de son expression. De plus, son profil d'expression en deux bandes transversales permet d'élucider les mécanismes par lesquels un même gène peut être régulé au sein de deux régions séparées, d'en découvrir les bases moléculaires et d'identifier celles qui diffèrent et celles qui sont au contraire partagées, révélant l'organisation sélectionnée par l'évolution. L'expression de *Krox20* est également très conservée au sein du taxon des vertébrés, et ses régulateurs transcriptionnels identifiés sont les mêmes au sein des différentes espèces étudiées. Cela permet d'utiliser indifféremment les modèles murins, aviaires ou ichthyens et de tirer partie des avantages de chacun en fonction de l'étude (figure 54), comme cela a été fait au cours des travaux présentés dans ce manuscrit.

La découverte des éléments cis-régulateurs A, B et C (Chomette et al., 2006) a constitué une avancée majeure dans l'étude du contrôle transcriptionnel de *Krox20*, en asseyant les bases moléculaires de ce contrôle et en permettant d'identifier les régulateurs directs (Wassef et al., 2008; Labalette et al., 2011). Toutefois, les régulateurs caractérisés n'étaient pas suffisants pour expliquer le profil d'expression de *Krox20* dans r3 et r5 puisque, d'une part, les acteurs induisant *Krox20* dans r5 via l'élément B sont également présents dans r6, et, d'autre part, que les facteurs Hox, Pbx et Meis responsables de l'expression de *Krox20* dans r3 via l'élément C sont aussi exprimés postérieurement.

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent plusieurs approches visant à analyser la fonction de l'élément C et à identifier de nouveaux FTs régulant l'expression de *Krox20* dans r3. Bien que les résultats obtenus n'aient pas conduit à la caractérisation complète d'un régulateur permettant d'expliquer comment l'expression de *Krox20* est restreinte à r3, ils ont mené à plusieurs avancées importantes pour la compréhension du contrôle transcriptionnel de *Krox20*. Celles-ci reposent sur :

- l'identification de plusieurs nouveaux acteurs impliqués dans la régulation de *Krox20* dans r3 grâce à l'étude sur la séquence de

Souris	<ul style="list-style-type: none"> - Proximité évolutive avec l'humain - Génome très bien renseigné - Techniques de génétique évoluées (Knock-out, Knock-In, ...) - Très nombreuses lignées génétiques disponibles
Poulet	<ul style="list-style-type: none"> - Suivi d'activité de séquences régulatrices simple et rapide par électroporation du tube neural - Gain de fonction par électroporation restreint dans l'espace et le temps - Taille et accessibilité des embryons
Poisson	<ul style="list-style-type: none"> - Construction de lignées transgéniques plus simple et rapide que pour la souris - Accessibilité et nombre des embryons - Gain et perte de fonction par injection d'ADN, d'ARN ou de morpholinos

Figure 54. Tableau récapitulatif des principaux avantages associés aux différents modèles utilisés dans ce travail de thèse.

l'élément C présentée en I et à la cartographie transcriptomique du rhombencéphale décrite en II.

- le suivi détaillé de la cinétique d'activité de l'élément C, en I, qui amène à reconsidérer le modèle classique d'activation de *Krox20* dans r3 reposant sur l'existence d'un facteur X antérieur (discuté plus bas).
- l'analyse de la régulation de l'élément C par la signalisation FGF, décrite en III et rendue possible par la redéfinition de l'élément C en I, permettant d'expliquer l'action originale des FGFs sur le positionnement de la frontière r3/r4.
- la mise en évidence de l'existence d'un autre élément initiateur dans r3 et de la coopération en *cis* entre les éléments A et C, par l'étude du mutant murin *Krox20^{Ac}* relatée en IV. Ce dernier point vient redéfinir le modèle de régulation de *Krox20*, qui proposait que l'élément C dans r3 et B dans r5 engagent le démarrage de l'expression de *Krox20* dont l'amplification et le maintien sont pris en charge par l'élément A, en montrant qu'un nombre plus important d'acteurs est impliqué et qu'ils peuvent intervenir sur différents aspects de l'expression de *Krox20*.

Une mise en perspective de ces différentes observations est proposée dans cette partie, en les combinant pour tenter de dégager un schéma général du contrôle transcriptionnel de *Krox20* dans r3 et de constituer un modèle dont les éléments sont ajoutés progressivement au fur et à mesure qu'ils sont discutés.

I. L'élément C est-il vraiment un initiateur ?

L'expression normale de *Krox20* chez les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC} jusqu'au stade 5 ss implique l'existence d'un autre élément régulateur impliqué dans le démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3, qui sera référencé comme C2 dans la suite de cette discussion. Il interroge également sur le rôle de l'élément C dans les phases initiales de l'expression de *Krox20*. En effet, la mise en évidence de la coopération de l'élément C avec l'élément A ouvre l'hypothèse que l'élément C pourrait n'intervenir que dans ce mécanisme. Cette question est centrale car elle influence un nombre important d'observations et d'interprétations réalisées lors d'études sur l'élément C, précédemment ou dans ce travail de thèse.

Plusieurs arguments indirects suggèrent que l'élément C intervient effectivement dans le démarrage de l'expression de *Krox20*, de façon redondante ou complémentaire avec C2.

1) Le suivi du profil d'activité de l'élément C, au sein de lignées transgéniques murines (pour l'ancien élément C) et ichthyennes (pour l'ancien et le nouvel élément C complet Ccœur), montre que celui-ci commence à être actif très précocement dans r3, avant que *Krox20* y soit détecté.

2) En cohérence avec cette observation, les études sur l'ancien élément C dans le mutant murin *Krox20*^{-/-} ont montré que l'activité de l'élément C était indépendante de la protéine *Krox20* (Chomette et al., 2006). De récents travaux réalisés par Charlotte Labalette chez des poissons-zèbres mutés pour *egr2b*, homologue ichthyen de *Krox20*, confirment que l'activité du nouvel élément C est également indépendante de *Krox20* pendant les phases précoces, au moins jusqu'au stade 2 ss.

3) De plus, bien que l'observation d'un nombre plus important d'embryons soit nécessaire pour l'établir tout à fait, l'extinction de l'expression de *Krox20* chez le mutant *Krox20*^{ΔA/ΔA} semble commencer légèrement plus tardivement que chez les souris *Krox20*^{ΔC/ΔC} (figure 50.C''' à comparer avec C'). Cela semble indiquer que l'élément C contribue à la production transcriptionnelle de *Krox20* dans les phases précoces de son expression, indépendamment de sa coopération avec l'élément A.

4) Enfin, comme détaillé dans les commentaires de la partie IV, le phénotype aggravé de perte d'expression de *Krox20* dans r3 chez le mutant *Krox20*^{KO/ΔC} (figure

50.D'') peut également s'interpréter comme résultant de l'implication de l'élément C dans la phases initiale de l'expression de *Krox20*.

Il est donc vraisemblable que l'élément C possède deux rôles : une activité de démarrage de l'expression de *Krox20*, en coopération, redondance ou complément de C2, et une action sur le maintien de cette expression par coopération en *cis* avec l'élément A, sans doute au moyen d'une boucle chromosomique rapprochant les éléments du promoteur de *Krox20*. La démonstration formelle de cette première activité initiatrice nécessiterait de localiser puis d'exciser l'élément C2 et des pistes sont proposées plus bas dans ce but. Des approches sont également discutées pour prouver la coopération physique entre les éléments A et C.

II. La mutagenèse de l'élément C et l'analyse transcriptomique par RNA-Seq ont permis l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation de *Krox20*

Les travaux présentés en I et II ont permis la caractérisation de blocs fonctionnels importants au sein de la séquence de l'élément C et l'identification de facteurs s'y fixant ou susceptibles de s'y fixer et régulant *Krox20*. Celle-ci a été réalisée en combinant les données de la littérature, indiquant à quelle famille de FTs pouvait correspondre le motif caractérisé sur l'élément C, et celles de l'analyse transcriptomique du rhombencéphale pour sélectionner les membres de la famille spécifiquement exprimés dans cette région. Le FT Sp5 a ainsi été défini comme un activateur direct de l'élément C se fixant sur la boîte SP/KLF. Le facteur de type bHLH Hes3 et le facteur Pou5f1 ont également été démontrés comme interagissant avec l'activité de l'élément C et régulant l'expression de *Krox20*, en l'inhibant pour Hes3 et l'activant pour Pou5f1. Ces facteurs pourraient potentiellement agir via trois boîtes E – motif de fixation aux bHLH –, dont une très conservée chez les vertébrés, et un site Pou situé dans la séquence del1a2 dont l'importance fonctionnelle a été montrée en I.

Le profil précoce d'expression de *Sp5* inclut tout le rhombencéphale et est étendu caudalement (Harrison et al., 2000), ce qui l'exclut d'un rôle dans la restriction spatiale de l'activité de l'élément C. En revanche, les travaux présentés en III suggèrent qu'il participe à la médiation du signal FGF sur l'élément C.

L'expression de *Pou5f1* est ubiquitaire. Cependant, une étude chez la souris montre qu'elle semble suivre un gradient rostro-caudal, au moins à 6 ss (Downs, 2008). Les résultats de cartographie transcriptomique montrent que l'expression de *Pou5f1* est plus importante dans le rhombencéphale que dans la partie antérieure, ce qui pourrait signifier qu'il s'exprime déjà selon un gradient à 2-4 ss. Ce gradient suit une direction opposée à celui défini par l'activité de l'élément C, ce qui est surprenant puisque nous montrons que Pou5f1 active l'élément C (figure 5 de la partie III). Des données supplémentaires permettront d'élucider ce point : l'étude de la mutation du site Pou sur l'élément C dans une lignée transgénique de poissons permettra de caractériser précisément la fonction de ce site tandis que le rôle de Pou5f1 pourra être analysé en

observant le profil d'activité de l'élément C au sein de mutants ichthyens *Pou2* (homologue de *Pou5f1* murin).

Enfin, l'expression de *Hes3* est très dynamique et occupe précocement une région antérieure dont la limite caudale semble être r2/r3 (figure 4 de la partie II). Ce profil est cohérent avec l'action inhibitrice sur l'élément C que nous mettons en évidence et *Hes3* pourrait constituer un répresseur limitant l'expansion antérieure de l'élément C (discutée plus bas). L'expression tardive de *Hes3* dans la partie dorsale de la majeure partie du tube neural à l'exception de r3 et r5 est également compatible avec un rôle répresseur de *Hes3* sur *Krox20*. L'étude de la mutation des sites bHLH de l'élément C au sein de lignées transgéniques de poisson permettra de mieux définir le rôle de ces facteurs dans la régulation de *Krox20*.

En effet, comme détaillé dans les commentaires du I, l'établissement de lignées transgéniques ichthyennes rend possible une observation nettement plus subtile et informative des effets d'une mutation sur le profil d'activité de l'élément C, en particulier précocement. Afin de poursuivre la caractérisation des séquences de l'élément C, il sera nécessaire d'établir ces lignées portant l'élément C muté pour les différents sites d'intérêt. Le système TALEN récemment mis au point ('Transcription Activator-Like Effector Nuclease', Moscou and Bogdanove, 2009; Cermak et al., 2011) offre l'opportunité d'insérer une construction génétique toujours au même endroit du génome. Il devient ainsi possible de s'affranchir des biais de position et de comparer en toute rigueur des lignées différentes portant l'élément C, sauvage ou muté pour le site d'intérêt, en amont d'un gène rapporteur.

III. La cartographie transcriptomique du rhombencéphale, une passerelle entre les séquences régulatrices et les régulateurs transcriptionnels

L'article de la partie II présente l'utilisation du RNA-Seq pour établir le répertoire transcriptomique quantitatif et différentiel du rhombencéphale murin en début de segmentation et son exploitation comme base de données afin d'identifier des régulateurs transcriptionnels de *Krox20* et de l'élément C. Cette approche permet donc d'accompagner la recherche de FTs à partir de blocs de séquence caractérisés comme fonctionnellement importants au sein d'éléments régulateurs.

En effet, si les séquences régulatrices constituent des outils puissants pour élucider les mécanismes par lesquels des FTs régulent leur cible, l'identification préalable de ces FTs à partir de la séquence de l'élément régulateur pose un véritable défi. Elle est en général réalisée à partir d'une approche par gène candidat, en s'appuyant sur les données de la littérature pour définir à quel type de famille de FTs correspond le ou les motifs de fixation contenus dans la séquence d'intérêt. Déterminer ensuite le membre de la famille qui interagit effectivement avec l'élément régulateur, physiquement et génétiquement, peut s'avérer long et fastidieux, voire irréalisable à échelle humaine lorsque les familles de FTs sont trop importantes. À titre d'exemple nous concernant directement, la famille SP/KLF compte 25 membres, la famille Ets 26 et plus de 110 facteurs bHLH sont répertoriés dans le génome murin. La cartographie transcriptomique permet donc un gain de temps considérable en se focalisant uniquement sur les FTs effectivement présents dans le rhombencéphale en début de segmentation.

Dans notre étude, nous avons effectué une seconde sélection en nous focalisant sur les gènes exprimés spécifiquement dans le rhombencéphale par comparaison avec la partie antérieure du tube neural. Ce choix reposait sur le fait que la plupart des acteurs connus de la segmentation du rhombencéphale et de la régulation de *Krox20* sont exprimés dans le rhombencéphale, parfois également dans la moelle épinière, mais pas antérieurement. Ils figuraient d'ailleurs parmi les gènes rapportés par le RNA-Seq comme étant exprimés les plus différentiellement, ce qui valide notre approche. Cette

étude nous a permis d'identifier de *novo* des facteurs susceptibles de jouer un rôle dans la segmentation du rhombencéphale.

Il n'est cependant pas exclu qu'une partie des acteurs importants exprimés dans le rhombencéphale le soient aussi dans la partie antérieure. Leur détection reste possible puisque les mesures dans les trois tissus (partie antérieure du tube neural, rhombencéphale, mésoderme) sont indépendantes. De plus, les mesures dans le mésoderme peuvent être utilisées pour éliminer les facteurs ubiquitaires. L'établissement du répertoire transcriptomique de la moelle épinière permettrait d'écartier également les facteurs exprimés de façon homogène dans le tube neural, donc peu susceptibles de jouer un rôle dans la régionalisation AP du rhombencéphale.

L'une des limites de l'approche par gène candidat est qu'elle ne permet d'identifier que des facteurs dont le motif de fixation est décrit dans la littérature. L'analyse du transcriptome murin ne permet pas de s'affranchir de cette contrainte mais constitue en revanche un complément utile pour les approches non biaisées telles que la purification de FTs, le crible simple hybride ou les puces à protéines, en permettant d'éliminer une partie des faux positifs. La purification de FTs repose sur l'utilisation de la séquence cible comme une sonde qu'on incube avec des extraits protéiques nucléaires. Les FTs fixés sont ensuite purifiés et identifiés par spectrométrie de masse. L'utilisation de la technique de purification de FTs est cependant restreinte par la grande quantité de matériel biologique qu'elle requiert. Le crible simple hybride consiste à cloner, chez la levure, la séquence d'intérêt en amont d'un gène de sélection et à croiser la souche obtenue avec une banque d'expression d'ADNc fusionnés à un domaine activateur de la transcription. Seules les protéines se fixant sur la séquence d'intérêt pourront activer la transcription du marqueur de sélection. Enfin, les puces à protéines sont, comme leur nom l'indique, des puces sur lesquelles sont fixés un ensemble de facteurs protéiques, choisis selon l'étude, qu'on incube avec la séquence d'intérêt préalablement marquée avec un fluorophore. Les interactions ADN-protéine sont ensuite détectées grâce au marqueur fluorescent.

Ces trois techniques sont limitées par leur fort taux de faux positifs, et faux négatifs, découlant vraisemblablement des conditions artificielles d'interaction ADN-protéine sur lesquelles reposent les cribles et expliquant la relativement faible quantité de publications faisant appel à elles. Michel Wassef, précédent doctorant au laboratoire, avait entrepris une collaboration avec l'équipe du Pr. Heng Zhu après qu'elle ait mis au

point des puces contenant la plupart des FTs humains (Hu et al., 2009), et testé sur ces puces le site SP/KLF et la boîte E la mieux conservée de l'élément C. Les résultats obtenus, confrontés au RNA-Seq et à la littérature, se sont révélés trop incohérents pour être exploités. L'approche par gène candidat reste donc la méthode privilégiée pour identifier des FTs interagissant avec les séquences régulatrices et le RNA-Seq réalisé dans cette étude permet d'accélérer grandement celle-ci.

IV. Un nouveau modèle pour le démarrage de l'expression de *Krox20* dans r3 et le positionnement des frontières

IV.1. Le profil d'activité de l'élément C suit initialement un gradient r3-r4

La redéfinition de l'élément C et son insertion au sein de lignées transgéniques ichthyennes a permis de suivre précisément sa cinétique d'activité et de montrer qu'elle présente initialement un gradient rostro-caudal dans la région r3-r4. Ce gradient est révélé de façon plus évidente suite à un gain de fonction FGF qui rehausse l'activité de l'élément C (figure 5.K de la partie III).

À partir de la fin du stade tailbud, l'activité de C se renforce et devient uniforme dans r3 et le gradient rostro-caudal n'est plus observé que dans r4. Ce renforcement coïncide avec l'apparition de *Krox20* dans r3 autour des stades 100% épibolie-tailbud et semble provenir, au moins dans un second temps, d'un mécanisme d'autorégulation indirecte. En effet, des expériences préliminaires, réalisées par Charlotte Labalette au laboratoire, montrent que le renforcement dans r3 n'apparaît plus à 8 ss au sein de mutants ichthyens de perte de fonction *krox20* (*egr2b*). De plus, *Krox20* induit directement l'expression de *Hox PG2* dans r3 qui peuvent ensuite activer l'élément C, de façon similaire aux *Hox PG1* (Wassef et al., 2008). Il est vraisemblable que le même phénomène soit à l'origine de l'activité tardive de C dans r5, ce qui pourra également être vérifié à l'aide du mutant *egr2b*.

Le gradient initial d'activité de l'élément C suppose l'existence d'un régulateur responsable de la mise en place de ce gradient. Un facteur lui-même exprimé selon un gradient AP, de même direction que C dans le cas d'un activateur ou opposé pour un répresseur, pourrait jouer ce rôle. Aucun des régulateurs identifiés dans ce travail de thèse ne satisfait à ces critères : *Sp5* est exprimé de façon homogène dans tout le rhombencéphale, *Hes3* est exprimé antérieurement précocement et montre une action inhibitrice vis à vis de l'élément C tandis que l'éventuel gradient d'expression de *Pou5f1* est incompatible avec son rôle d'activateur de l'élément C. La poursuite des études sur l'élément C est donc nécessaire pour identifier ce régulateur. La séquence del1a2, caractérisée dans la partie I, pourrait servir de point de départ à ces études puisque sa délétion produit une baisse d'activité dans r3 et un renforcement dans r4, ce qui indique

qu'elle pourrait contenir un site de fixation au régulateur responsable de l'établissement du gradient d'activité de l'élément C.

IV.2 Un nouveau modèle du contrôle de l'expression de *Krox20* basé sur le profil en gradient de l'activité de l'élément C

Les Hox PG1 présentent deux modes d'action antagonistes sur l'expression de *Krox20*. En effet, d'une part, les Hox PG1 activent l'élément C et sont donc impliqués dans le démarrage de l'expression de *Krox20*. D'autre part, ils semblent réprimer *Krox20* dans r4, comme le suggère l'expansion postérieure du territoire r3 chez le double mutant murin *Hoxa1-Hoxb1* (Studer et al., 1998; Rossel and Capecchi, 1999).

Afin d'expliquer cette action bivalente, Michel Wassef avait postulé l'existence d'un facteur X exprimé antérieurement (figure 55.A) nécessaire à l'expression de *Krox20* mais non suffisant. Le chevauchement de son territoire d'expression avec celui des Hox PG1 entraînerait l'activation de *Krox20* (figure 55.B), tandis que postérieurement l'action des Hox PG1 serait inhibitrice. Cette hypothèse s'appuyait sur des expériences montrant l'existence de cellules dans la partie postérieure de r3 exprimant ou ayant exprimé *Hoxb1* ou *Hoxa1* (figures 55.D-F", Wassef et al., 2008; Makki and Capecchi, 2010). L'expansion postérieure du facteur X déterminerait ensuite la position de la frontière r3/r4 (figure 55.C).

Le gradient d'activité de l'élément C et de récents travaux réalisés par Charlotte Labalette au laboratoire permettent d'affiner ce modèle. En effet, Charlotte a découvert que l'élément autorégulateur A était inhibé par *hoxb1*, via l'induction de l'expression des répresseurs *nlz*. Ce point confirme la répression de *Krox20* par les Hox PG1 et permet de proposer un modèle de contrôle de l'expression de *Krox20*, basé sur le gradient initial d'activité de l'élément C et le rôle d'amplificateur de l'élément A (figures 56.A-C).

Dans le modèle que je propose, le facteur X antérieur est remplacé par un facteur Y, régulant l'élément C et lui-même exprimé selon un gradient AP (figure 56.A). Ce régulateur est présenté ici comme un répresseur mais, comme discuté plus tôt, il peut aussi s'agir d'un activateur dont le gradient d'expression sera alors opposé. L'élément C est activé quand l'expansion antérieure du domaine d'expression des Hox PG1 atteint le niveau où la répression par Y est suffisamment faible (figure 56.B).

Précédent modèle de contrôle transcriptionnel de *Krox20*

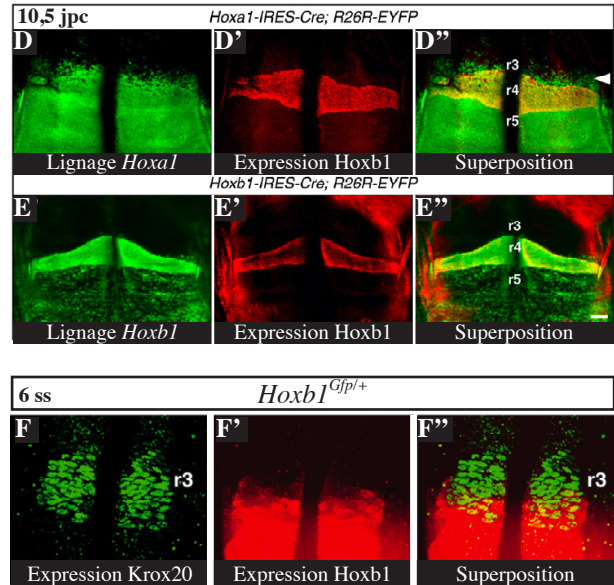
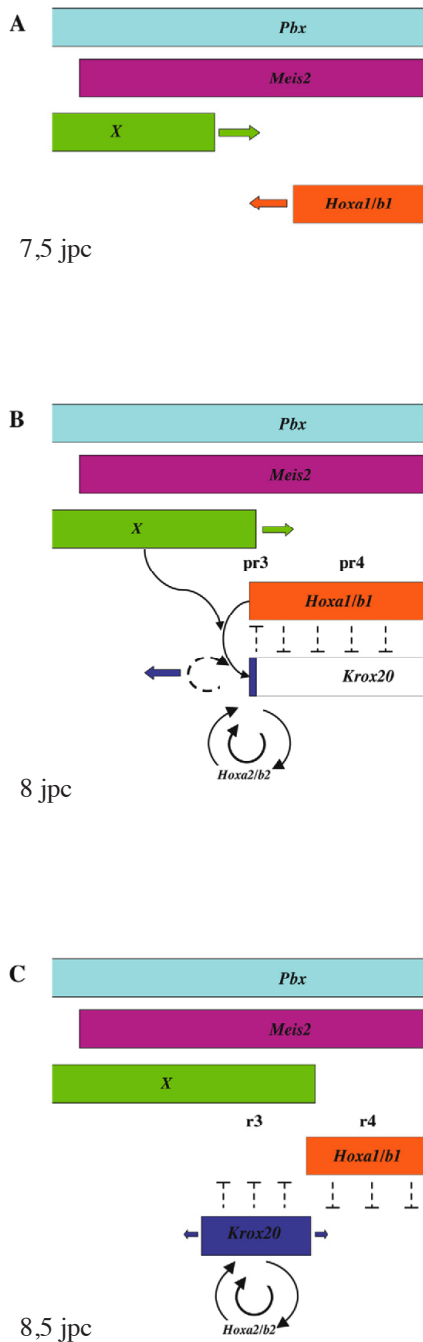


Figure 55. Précédent modèle d'activation de *Krox20* dans r3 (Wassef et al., 2008)

A-C: il avait été précédemment postulé l'existence d'un facteur X antérieur nécessaire mais non suffisant à l'activation de l'expression de *Krox20* (A). Le chevauchement des territoires d'expression de X et des *Hox* PG1 entraînerait le démarrage de l'expression de *Krox20* dans une fine bande de cellules (B). L'extension du territoire d'expression de *Krox20* reposerait ensuite sur des mécanismes d'autorégulation directe et indirecte et de répression de *Hoxb1*. L'expansion postérieure de X positionne la frontière r3/r4. Extrait de Wassef et al., 2008.

D-E'': Des expériences de lignage montrent qu'un nombre important de cellules situées dans la partie postérieure de r3 ont exprimé *Hoxa1* (D-D''). Ce nombre est plus réduit pour *Hoxb1* (E-E''), en cohérence avec le fait que la limite antérieure du territoire d'expression de *Hoxa1* est plus rostrale (Alexander et al., 2009). Le

lignage des gènes est en vert tandis que r4 est visualisé par immunofluorescence contre *Hoxb1* (en rouge). Les embryons sont montés à plat. Extrait de Makki and Capecchi, 2010

F-F'': Michel Wassef a également montré qu'à 6 ss, entre un tiers et la moitié des cellules exprimant *Krox20* (détecté par immunofluorescence contre *Krox20*) exprimaient également *Hoxb1* (détecté par immunofluorescence contre la *Gfp* dans une lignée *Hoxb1^{Gfp/+}*). Ce nombre plus important que celui apparaissant en E'' suggère qu'une partie des cellules du territoire r4 ont exprimé transitoirement *Krox20* (voir V.3 dans la discussion). Extrait de Wassef et al., 2008.

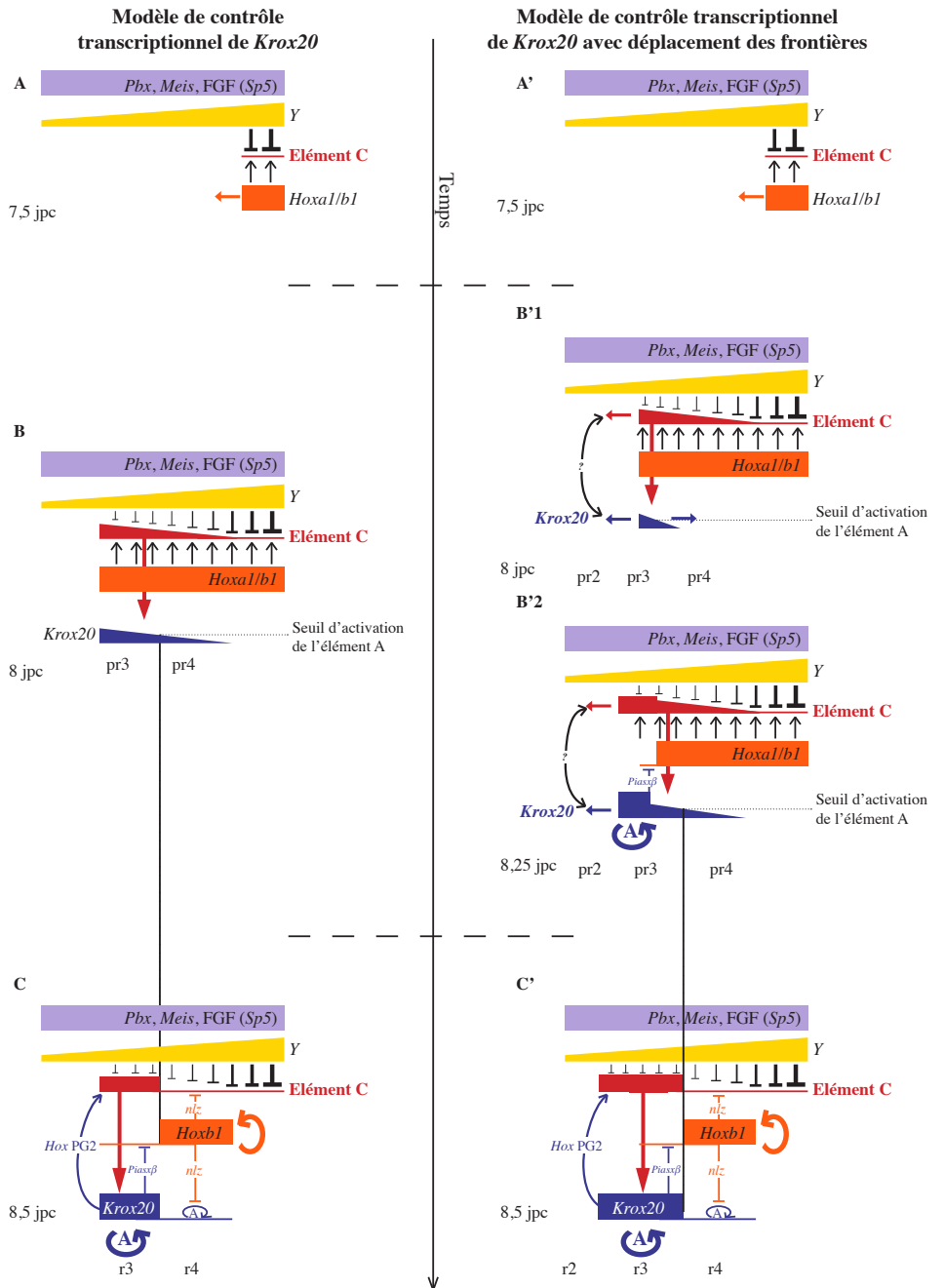


Figure 56. **Modèles d'activation de *Krox20* dans r3 reposant sur le gradient d'activité de l'élément C**

A-C: Le modèle proposé dans cette discussion ne nécessite plus la présence d'un facteur antérieur restreint mais repose sur le profil d'activité en gradient rostro-caudal de l'élément C, induit par la présence d'un facteur répresseur Y dont l'expression suit un gradient opposé (ou d'un activateur suivant le même gradient que C)(A). L'élément C est activé quand la progression antérieure du territoire d'expression des *Hox* PG1 atteint un domaine où la répression par Y est suffisamment faible (B). La frontière r3/r4 correspond au niveau d'activité de l'élément C dont la traduction en terme de production transcriptionnelle de transcrits *Krox20* est suffisante pour déclencher l'élément autorégulateur A (C). Postérieurement à cette frontière, l'expression de *Hoxb1* se renforce par autorégulation, ce qui entraîne la répression de *Krox20* à travers l'action des nlz sur les éléments A et C. Antérieurement, *Krox20* régule sa propre expression directement via l'élément A et indirectement via l'élément C et inhibe celle de *Hoxb1*, potentiellement à travers la séquestration du co-activateur *Piasxβ*.

A'-C' : une version plus évoluée du modèle d'activation de *Krox20* permet d'expliquer l'expansion postérieure du territoire d'expression de *Krox20*. Le profil d'activité en gradient de l'élément C entraîne que les cellules les plus postérieures du futur r3 mettent plus de temps à exprimer *Krox20* à un niveau suffisant pour activer l'élément A. Dans r4, ce niveau n'atteint jamais le seuil d'activation de l'élément A et l'expression de *Krox20* est ensuite inhibée par *Hoxb1*. L'expansion antérieure du domaine d'activité de l'élément C et du territoire d'expression de *Krox20* est en revanche inexplicquée, et la hiérarchie entre ces deux événements n'est pas connue.

jpc : jour post-coïtum, pr : pré-rhombomère, r : rhombomère.

La conversion de l'expression en gradient de *Krox20*, induite par l'élément C, en une expression de type 0 ou 1 avec un domaine r3 exprimant fortement et de façon homogène *Krox20* et un domaine r4 où il n'est pas exprimé, repose sur l'activité de l'élément A. L'élément A est en effet le siège d'une boucle d'autorégulation très efficace et Yassine Bouchoucha a montré que son action était celle d'un interrupteur moléculaire (Bouchoucha et al., en préparation), caractérisé par un seuil de protéines *Krox20* nécessaire à son déclenchement et sa très forte production transcriptionnelle. Il en résulte que les cellules ayant produit suffisamment de transcrits *Krox20* pour activer l'élément A voient l'expression de *Krox20* amplifiée et maintenue, ce qui verrouille leur identité vers un destin de cellules productrices de *Krox20*, c'est-à-dire une identité de type r3 versus r4. La frontière r3/r4 correspond au niveau d'activité de l'élément C dont la traduction en terme de quantité de transcrits *Krox20* produits permet d'activer l'élément A (figure 56.C). Cette frontière est ensuite stabilisée par les mécanismes d'autorégulation et de répression croisée entre *Krox20* et *Hoxb1*.

Antérieurement, *Krox20* inhibe l'expression des *Hox* PG1, potentiellement à travers la séquestration du coactivateur *Piasxβ* (Garcia-Dominguez et al., 2006), autorégule sa propre expression via l'élément A et renforce l'activité de l'élément C au moyen d'une boucle d'autorégulation indirecte, impliquant vraisemblablement les *Hox* PG2 .

Postérieurement à la frontière r3/r4, le niveau de *Krox20* produit est trop faible pour activer l'élément A et réprimer *Hoxb1*. Au contraire, l'expression de *Hoxb1* va se renforcer par autorégulation et induire celle des répresseurs *nlz* qui vont ensuite inhiber l'élément A, le rendant complètement inactif ou élevant son seuil d'activation, ce qui assure qu'aucune cellule ne co-exprime fortement à la fois *Krox20* et *Hoxb1*, en particulier au niveau de la frontière r3/r4.

L'activité de l'élément C disparaît de r4 à partir du stade 10 ss alors que *Hoxb1* est toujours exprimé fortement dans ce rhombomère à ce stade. Un mécanisme additionnel est donc responsable de cette extinction. De façon intéressante, il pourrait faire intervenir, ici également, les facteurs *nlz*, induits par les fortes concentrations de *Hoxb1* dans r4 (figure 56.C). Charlotte Labalette a en effet montré que l'élément C était aussi réprimé par les facteurs *nlz*. Il serait donc possible que les *Hox* PG1 exercent une activité duale sur l'élément C, en l'activant directement puis en le réprimant indirectement via l'induction des répresseurs *nlz*. Ce mode d'action bivalent pourrait

reposer sur la nécessité d'une dose plus forte de facteurs Hox PG1 requise pour activer l'expression des *nlz* que pour activer celle de *krox20*, phénomène que Charlotte Labalette a mis en évidence. Ainsi, des niveaux modérés de Hox PG1 activeraient l'élément C, tandis que des niveaux importants l'inhiberaient, par l'intermédiaire des *nlz*.

De très récents résultats de Charlotte suggèrent que les *nlz* puissent être impliqués également dans la phase précoce de l'activité de l'élément C. En effet, l'inactivation de la traduction des *nlz* par injection de morpholinos dans des embryons de poissons entraîne une expansion postérieure importante du territoire d'activité de l'élément C au stade 100% épibolie. Toutefois, l'élément C présente toujours un profil en gradient dans ces embryons, suggérant qu'un autre facteur est responsable de son établissement. La caractérisation du rôle des *nlz* sur l'activité de l'élément C pendant la phase d'initiation de *Krox20* est en cours d'investigation dans le laboratoire.

Pour conclure, le modèle présenté est pour l'instant incomplet puisqu'il entraîne que *Krox20* doit être exprimé transitoirement dans r4, sur un niveau relativement étendu, du fait de l'activité de l'élément C dans ce rhombomère. Or *Krox20* n'est pas détecté dans r4, sauf éventuellement dans sa partie la plus antérieure (voir V.3. dans cette partie). Cette incohérence découle du paradoxe lié à l'activité de l'élément C dans r4, discuté plus bas (V). Un modèle plus complet est également proposé (figure 58).

IV.3. Le profil de l'élément C permet d'expliquer la dynamique et le positionnement final de la frontière r3/r4

Dans le modèle proposé, le positionnement de la frontière r3/r4 repose sur le gradient d'activité de l'élément C, combiné aux mécanismes d'autorégulation et de répression croisée de *Krox20* et de *Hoxb1*.

Les travaux décrits en III montrent comment la modification du signal FGF déplace la frontière r3/r4, en modulant l'intensité de l'activité de l'élément C, mais pas son gradient. Ils permettent d'expliquer l'action inattendue des FGFs sur r3, qui ne suit pas le modèle classique pour un morphogène diffusant depuis r4 (figure 48). Réduire le signal FGF dans le rhombencéphale entraîne une diminution de l'activité de l'élément C et donc un déplacement antérieur de la frontière r3/r4, c'est-à-dire de la coordonnée AP où le niveau d'activité de l'élément C est associé à une production d'ARNm puis de protéines *Krox20* permettant d'activer l'élément A (figure 7 de partie III des résultats).

En revanche, l'établissement de la frontière r2/r3 repose sur des mécanismes non élucidés. En effet, les expériences de traçage montrent que seules les cellules les plus caudales de r3 ont exprimé *Hoxa1* (figures 55.D-D'). Cela signifie que le domaine d'expression de *Krox20* s'est étendu antérieurement. En fait, des expériences reposant sur le croisement de lignées portant des gènes rapporteurs nécessitant des temps d'accumulation différents pour être détectés ont mis en évidence que le domaine d'expression de *Krox20* s'étendait effectivement antérieurement, et postérieurement, dans r3 de façon à peu près égale (Voiculescu et al., 2001), ce qui est cohérent avec les expériences de traçage. Une version plus détaillée de notre modèle peut expliquer l'expansion postérieure, en se basant toujours sur l'activité en gradient de l'élément C (figures 56.A'-C'). Elle reposerait sur le fait que les cellules les plus postérieures du futur r3, soumise à un gradient d'activité de C plus faible, nécessiteraient un temps plus long pour accumuler suffisamment de transcrits *Krox20* et activer l'élément A. En revanche, l'expansion antérieure nécessite de poursuivre les recherches.

De façon intéressante, la limite antérieure d'activité de l'élément C suit la limite antérieure d'expression de *Krox20* (figure 43.B-I), ce qui signifie que le territoire d'activité de l'élément C progresse également antérieurement. Ce comportement peut s'interpréter de deux façons : 1) Il peut être la conséquence de l'autorégulation indirecte de l'élément C par *Krox20* dont la progression antérieure résulte d'un autre mécanisme. 2) Au contraire il pourrait être le moteur de l'expansion antérieure de *Krox20*. Dans ce second cas, la poursuite des études sur l'élément C et les FTs régulant son activité devrait permettre de mettre à jour les acteurs responsables de ce mécanisme. Une possibilité est que l'apparition de *Hoxa2*, exprimé de r2 à r5, activerait l'élément C antérieurement et qu'un répresseur antérieur limiterait cette expansion au niveau de la future frontière r2/r3. Le profil d'expression antérieure de *Hes3* aux stades précoces serait compatible avec ce rôle.

V. Activité de l'élément C dans r4

V.1. Des séquences répressives inhibent l'activité de l'élément C dans r4

L'activité de l'élément C dans r4 soulève un paradoxe : elle signifie que l'élément C est capable d'induire la transcription d'un gène rapporteur dans ce rhombomère alors que les transcrits *Krox20* n'y sont jamais détectés.

Deux hypothèses permettraient d'expliquer cette observation : 1) l'existence d'un mécanisme actif de dégradation ciblant l'ARNm *Krox20* dans r4 et auquel l'ARNm du gène rapporteur échapperait 2) le rapprochement artificiel entre l'élément C et le gène rapporteur dans les constructions utilisées qui pourrait générer une activité anormalement forte de l'élément C dans r4.

Ces deux hypothèses sont mises en défaut par l'insertion, par transgénèse murine, du BAC 121 de poulet contenant 150 kb de séquences situées autour et incluant le locus *Krox20* (figure 57.A, Chomette et al., 2006)). Dans ces souris transgéniques, des concentrations élevées de transcrits *Krox20* sont détectées dans r4 (figure 57.B). Cela prouve que l'hypothèse proposant l'existence d'un mécanisme actif de dégradation de l'ARNm *Krox20* dans r4 n'est pas suffisante pour expliquer pourquoi il n'est pas détecté dans ce rhombomère dans des souris sauvages. De plus, ce BAC contient les éléments A, B et C situés en amont du promoteur de *Krox20* aux mêmes distances que dans le génome de poulet. L'activité transcriptionnelle induite par l'élément C semble donc être identique lorsque celui-ci est situé à 50 kb en amont du promoteur de *Krox20* et cela suggère fortement que l'élément C endogène possède intrinsèquement une activité dans r4.

Celle-ci est donc réprimée lorsque l'élément C se trouve à sa position endogène, vraisemblablement via l'action de séquences situées en dehors du BAC 121. Ces séquences peuvent être des silenciers recrutant des FTs réprimant *Krox20* ou établissant un environnement chromatinien de type répressif, dans r4 au moins, ces deux hypothèses constituant probablement les deux versants d'un même phénomène. Par exemple, la répression par les Polycomb faisant intervenir des boucles chromosomiques, l'insertion du BAC de façon aléatoire dans le génome pourrait disjoindre les sites sur le

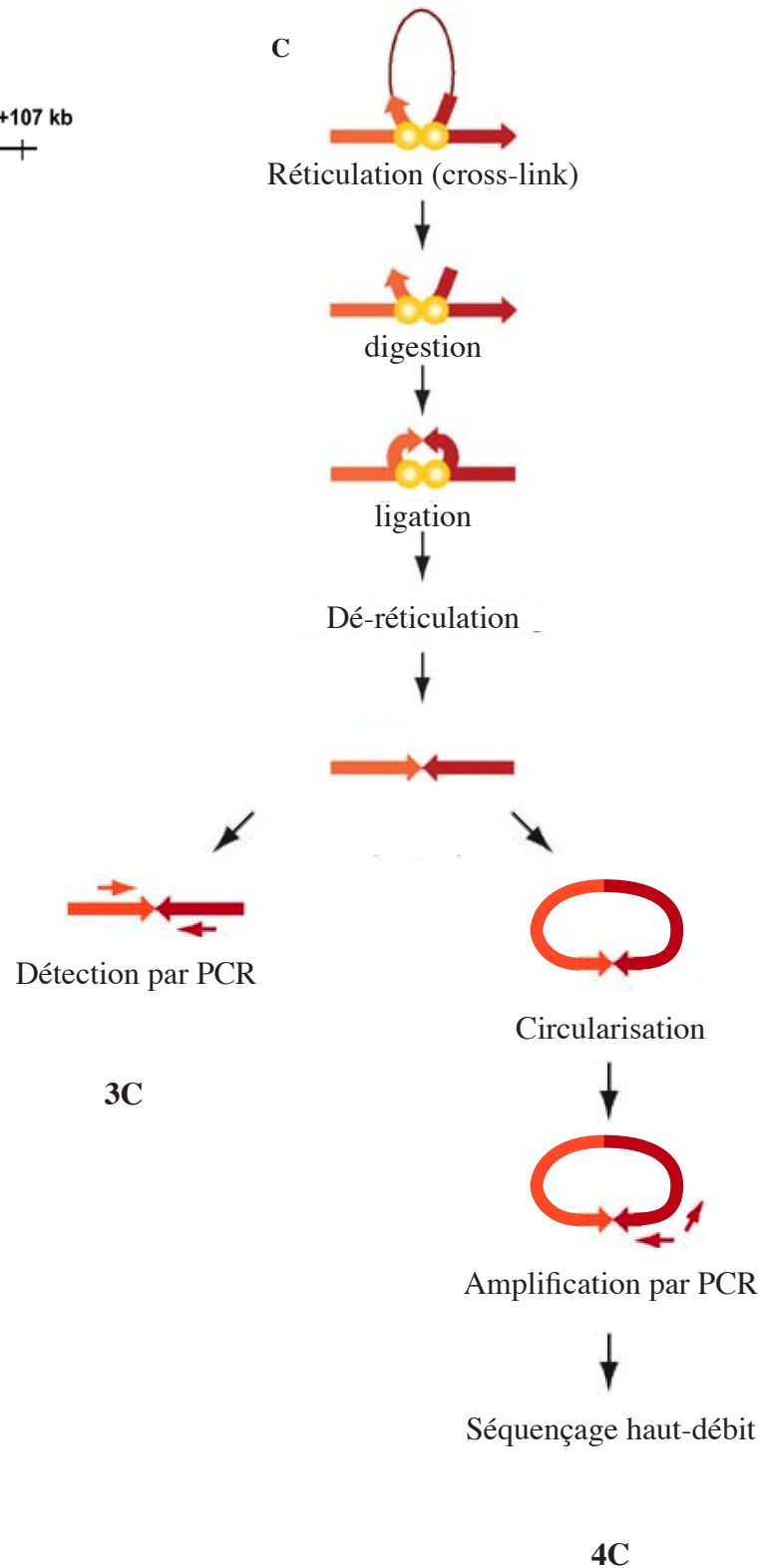
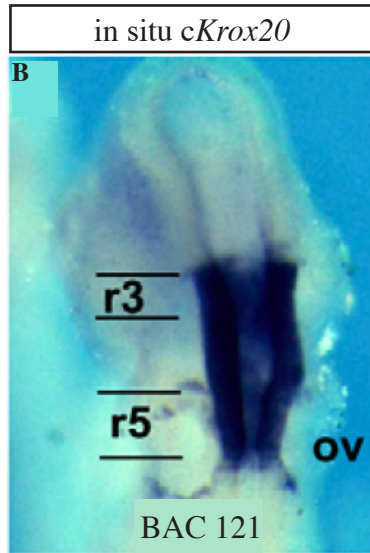


Figure 57. **Activité de l'élément C dans r4**

A: Schéma du BAC 121 aviaire utilisé en transgénèse chez la souris lors de l'identification des éléments régulateurs A, B et C (Chomette et al., 2006). L'emplacement des éléments est indiqué.

B: Hybridation in situ contre le transcrit *Krox20* de poulet dans un embryon de souris à 9 jpc au sein duquel a été inséré le BAC 121 par transgénèse.

Extrait de Chomette et al., 2006

C: Schéma des principales étapes des techniques de 3C et de 4C.

Adapté de Dostie et al., 2007.

BAC impliqués dans ces boucles de ceux situés en dehors du BAC et empêcherait le processus répressif de se mettre en place.

L'identification fonctionnelle d'un silencer est un processus compliqué, surtout si celui-ci ne porte qu'une activité répressive et dans notre cas plus particulièrement puisque cet élément répresseur est situé en dehors du BAC 121, donc à plusieurs centaines de kb.

V.2. Identification des séquences répressives et mise en évidence des interactions entre éléments régulateurs et promoteur

La méthode conceptuellement la plus simple pour tenter d'identifier ce silencer consisterait à utiliser la technique de 4C (« Circular Chromosome Conformation Capture », figure 57.C). Celle-ci est une extension de la technique de 3C (figure 57.C) qui permet de mettre en évidence des interactions physiques entre deux régions génomiques éloignées en réticulant l'ADN ('cross-link'), ce qui va figer les interactions chromosomiques, puis en hydrolisant l'ADN à l'aide d'endonucléases afin de séparer les fragments non réticulés du complexe. Les extrémités des complexes réticulés sont ensuite soudées par ligation et l'interaction entre deux régions éloignées du génome peut alors être détectée par PCR. Dans le cas du 4C, la PCR finale est remplacée par une étape de ligation supplémentaire visant à obtenir des fragments d'ADN circulaires et amplifier par PCR tous ceux contenant un locus donné dans le génome. Les interactions de ce locus avec le reste du génome sont ensuite caractérisées au moyen d'un séquençage haut-débit.

Le 4C devrait donc nous permettre d'identifier les régions avec lesquelles interagissent le locus *Krox20* et ses éléments régulateurs. Cependant, l'utilisation du 4C est limitée par la quantité importante de matériel qu'il requiert, liée aux étapes de réticulation et de ligation. Il est toutefois possible que la répression de l'élément C dans r4 soit un mécanisme par défaut, présent dans tout l'embryon hormis r3 et r5 et également en œuvre à des stades ultérieurs, ce qui permettrait de rassembler plus facilement de grandes quantités de matériel biologique.

Une autre méthode pour caractériser la répression de l'élément C dans r4 consisterait à observer directement l'organisation spatiale de la région intergénique située en amont du locus *Krox20*, contenant les éléments A, B et C, à l'aide d'hybridation

in situ fluorescente dirigée contre l'ADN combinée à de la microscopie confocale permettant une reconstruction en 3 dimensions de l'image (3D DNA FISH). Cette technique a par exemple été utilisée pour étudier le déplacement hors de son territoire chromosomique du locus *Hoxb1*, observé spécifiquement dans r4 (Chambeyron et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs montrent également que, contrairement à *Hoxb1*, le locus *Hoxb9* demeure au sein de son territoire chromosomique, et sont donc en mesure d'analyser des différences de comportement de régions d'ADN espacées d'environ 100 kb. Cette distance est du même ordre de grandeur que celle des éléments régulateurs entre eux et vis à vis du promoteur de *Krox20*, chez la souris (figure 38). Il devrait donc être possible de mettre en évidence une organisation spatiale différente des éléments A et C et du promoteur de *Krox20* dans r3, vraisemblablement regroupés au sein d'une boucle chromosomique, et dans r4 où il est attendu que les éléments A et C soient maintenus à distance du promoteur.

Cette approche permettrait de montrer physiquement l'existence d'une boucle chromosomique entre A, C et le promoteur de *Krox20*, d'observer comment l'excision de l'élément C ou de l'élément A modifie cette boucle et de décrire ainsi le mécanisme moléculaire sur lequel s'appuie la coopération en *cis* entre les éléments A et C, démontrée par les expériences génétiques présentées en IV. De plus, elle pourrait également être utilisée pour identifier le silencer impliqué dans la répression de la transcription de *Krox20* dans r4, en testant l'interaction avec l'élément C ou le promoteur de *Krox20* d'un ensemble de régions candidates sélectionnées sur la base de leur profil de conservation et de leur signature chromatinienne, disponible dorénavant grâce aux résultats du projet ENCODE. L'utilisation des profils de conservation et de signature chromatinienne est une approche proposée également pour identifier l'élément C2 et est discutée plus bas.

V.3. Intégration des séquences répressives au modèle de contrôle transcriptionnel de *Krox20*

La présence de séquences impliquées dans la répression de *Krox20* permet de réconcilier notre modèle avec l'absence d'expression de *Krox20* dans r4. En effet, elles laissent supposer que l'élément C est en compétition avec un processus répressif et entraîne qu'un seuil minimum d'activité de l'élément C puisse être nécessaire pour

Modèle de contrôle transcriptionnel de *Krox20* incluant un mécanisme de répression

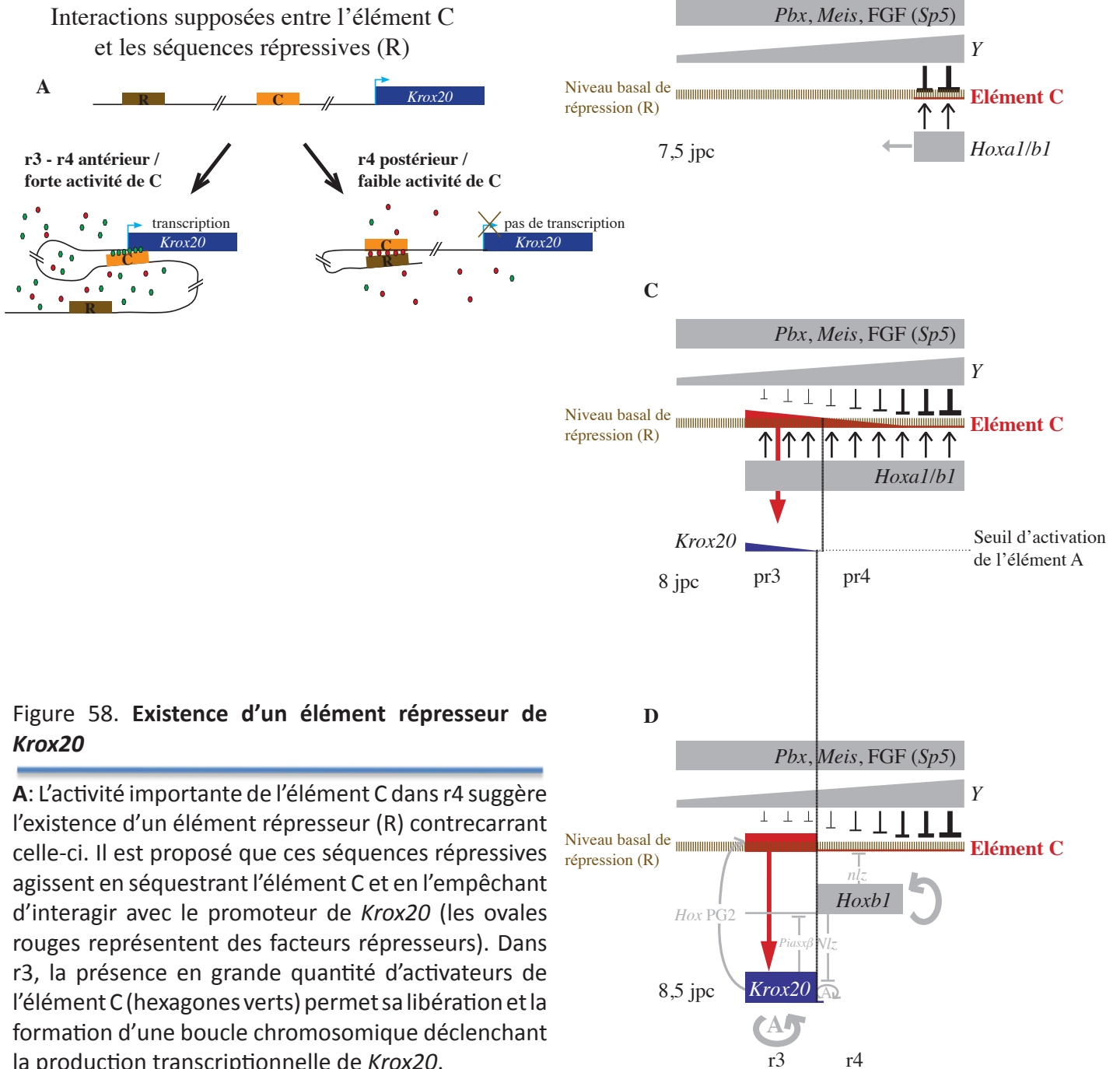


Figure 58. Existence d'un élément répresseur de *Krox20*

A: L'activité importante de l'élément C dans r4 suggère l'existence d'un élément répresseur (R) contrecarrant celle-ci. Il est proposé que ces séquences répressives agissent en séquestrant l'élément C et en l'empêchant d'interagir avec le promoteur de *Krox20* (les ovales rouges représentent des facteurs répresseurs). Dans r3, la présence en grande quantité d'activateurs de l'élément C (hexagones verts) permet sa libération et la formation d'une boucle chromosomique déclenchant la production transcriptionnelle de *Krox20*.

B-D: Intégration d'une activité répressive basale dans le modèle de contrôle transcriptionnel de *Krox20* (B). La limite postérieure d'expression de *Krox20* correspond au seuil à partir duquel l'activité de l'élément C surpasse la répression induite par les séquences inhibitrices (C). L'autorégulation par l'élément A permet ensuite d'uniformiser l'expression de *Krox20* dans r3 et de produire une frontière r3/r4 nette (D). Pour simplifier la lisibilité de la figure, les éléments non modifiés par rapport au modèle de la figure 54.A-C sont grisés.

jpc : jours post-coïtum, pr : pré-rhombomère, r : rhombomère.

permettre une production effective de transcrits *Krox20*. Un mécanisme moléculaire simple pour expliquer cette activité inhibitrice pourrait reposer sur la séquestration de l'élément C par des séquences répressives, bloquant son interaction avec le promoteur de *Krox20* (figure 58.A). Lorsque la concentration en facteurs activant l'élément C dépasse un certain seuil, celui-ci va pouvoir se libérer de son interaction avec les séquences répressives et induire l'expression de *Krox20*.

Dans le modèle, ce phénomène se traduit par l'adjonction d'un niveau basal et ubiquitaire de répression que l'activité de l'élément C doit dépasser pour mener à la transcription effective de *Krox20* (figures 58.B-D). Il en résulte d'une part qu'un niveau nettement plus faible de transcrits *Krox20* est dorénavant nécessaire pour activer l'élément A, ce qui cohérent avec son rôle d'interrupteur moléculaire. D'autre part, seules les cellules les plus antérieures de r4 doivent exprimer *Krox20*, à un niveau très faible. Elles correspondent aux cellules dont l'activité de l'élément C a dépassé le seuil de répression basale mais n'est pas suffisante pour que la production de transcrits *Krox20* en résultant permette l'activation de l'élément A. Cette expression est transitoire car ensuite l'élément C est inactivé dans r4.

Il n'a pas été démontré formellement que des cellules de r4 ont exprimé *Krox20*. En revanche, la combinaison des études montrées sur la figure 55 suggère que cela puisse être le cas. En effet, les expériences de lignage *Hoxb1* révèlent qu'un nombre très limité de cellules de r3 a exprimé transitoirement *Hoxb1* (figures 55.E-E''). Au contraire, le suivi de l'expression de *Krox20*, par immunofluorescence contre *Krox20*, et de *Hoxb1*, par immunofluorescence contre la Gfp dans une lignée *Hoxb1^{Gfp/+}* chez des embryons de souris à 6 ss, montre qu'entre un tiers et la moitié des cellules contenues dans le territoire d'expression de *Krox20* expriment également *Hoxb1* (figures 55.F-F'', Wassef et al., 2008). Il est donc probable que les cellules co-exprimant *Krox20* et *Hoxb1* à 6 ss n'aient pas toutes été spécifiées en r3 et qu'une partie a au contraire perdu l'expression de *Krox20* et maintenu celle de *Hoxb1*, et a donc été adopté une identité r4. Le suivi du lignage *Krox20*, en croisant des souris *Krox^{Cre}* avec des souris portant un système rapporteur inductible par recombinaison, permettra de s'assurer de ce point.

VI. Coopération en *cis* entre les éléments A et C

L'analyse des mutants murins $Krox20^{AC/\Delta C}$ et $Krox20^{AC/\Delta A}$ a mis en évidence la coopération en *cis* entre l'élément C et l'élément autorégulateur A, ce qui constitue l'une des premières démonstrations directes de ce type d'activité entre deux éléments régulateurs chez les métazoaires. Les « shadow enhancers » chez la drosophile (voir introduction) peuvent être considérés comme une forme de coopération entre séquences régulatrices dans des conditions particulières de développement (stress environnemental ou génétique). Plus récemment, une étude sur le cluster *HoxD* murin a montré que la régulation transcriptionnelle du gène *Hoxd13* dans les bourgeons de membres était contrôlée par un archipel d'éléments régulateurs espacés de plusieurs centaines de kb et interagissant physiquement entre eux (Montavon et al., 2011). Ces études n'ont cependant pas la portée de la démonstration génétique présentée dans la partie IV, qui s'appuie sur les locus endogènes des éléments régulateurs et qui montre que l'excision de l'élément C entraîne l'inactivation en *cis* de l'élément A, malgré un niveau initial de transcrits *Krox20* vraisemblablement similaire. Elle enrichit la fonction de l'élément C qui, en plus de son rôle potentiel d'initiateur de l'expression de *Krox20*, intervient ainsi également dans la phase d'amplification et de maintien de celle-ci (figure 59).

Cette activité de coopération pourrait reposer sur la formation d'une boucle chromosomique qui rapprocherait l'élément A du promoteur de *Krox20* (figures 59.A-D). L'élément C serait indispensable à la formation de cette boucle dans r3 tandis que dans r5 l'élément B pourrait assurer cette fonction puisque l'expression de *Krox20* n'y est que très partiellement affectée chez les mutants $Krox20^{AC/\Delta C}$. Toutefois, le phénotype plus marqué dans r5 chez le mutant $Krox20^{KO/\Delta C}$ suggère que C contribue tout de même à la formation de la boucle chromosomique dans r5.

L'existence de facteurs spécifiques se fixant à l'élément C et aux régions promotrices de *Krox20* et recrutant l'élément A pourrait expliquer comment l'excision de l'élément C entraîne l'inactivité de l'élément A, en empêchant son rapprochement du promoteur de *Krox20*. Ces facteurs peuvent être nécessaires uniquement pour le recrutement ou au contraire pendant toute la période d'activité de l'élément A. De très

récents travaux réalisés par Élodie Thierion, doctorante au laboratoire, suggèrent que nous sommes plutôt dans la deuxième situation car les souris *Krox20*^{Cre/Clox} montrent une extinction précoce de l'expression de *Krox20* dans r3, malgré la présence physique de l'élément C pendant la phase initiale d'expression de *Krox20*. Les expériences de 3D DNA FISH proposées plus haut devraient permettre de mettre en évidence les interactions chromosomiques entre les éléments A, C et le promoteur de *Krox20*.

VII. Rôle et identification de l'élément C2

Pour conclure, l'analyse du mutant murin *Krox20*^{ΔC/ΔC} a démontré l'existence d'un élément régulateur additionnel impliqué dans le démarrage de l'expression de *Krox20*, dans r3 au moins. Cet élément est insuffisant pour maintenir l'expression de *Krox20* dans r3 chez les mutants *Krox20*^{ΔC/ΔC}. La découverte de l'élément C2 vient ajouter une composante importante dans le contrôle transcriptionnel de *Krox20* (figure 59.E-H) et élargir notre vision de celui-ci. Il soulève d'intéressantes questions. Par exemple, quelles peuvent être les raisons, si elles existent, expliquant l'existence de deux éléments régulateurs impliqués dans la même activité initiatrice ? Cette existence de deux enhancers potentiellement redondants rappelle le cas des « shadow enhancers » chez la drosophile et les deux éléments initiateurs pourraient procurer de la robustesse au système en assurant que l'expression de *Krox20* démarre au bon moment ou qu'elle soit indépendante des conditions environnementales ou de background allélique (voir introduction sur les « shadow enhancers »). Il sera intéressant également de déterminer si les facteurs régulant les éléments C et C2 sont différents. L'étude de ces questions et la poursuite de la caractérisation du contrôle transcriptionnel de *Krox20* requièrent d'identifier l'élément C2.

Une première approche dans ce but consisterait supposer que l'élément C2 puisse correspondre à l'une des régions intergéniques conservées, situées en amont de *Krox20* (figure 60). En effet, les séquences régulatrices sont soumises à des contraintes évolutives plus importantes que l'ADN non fonctionnel les entourant et peuvent présenter un degré de conservation significativement plus important, comme cela est observé pour les éléments A, B et C. La forte conservation de la dynamique d'expression de *Krox20* chez les vertébrés renforce la probabilité que les éléments régulateurs la contrôlant soit conservée.

L'activité transcriptionnelle des séquences situées en amont et en aval de *Krox20* a été testée de façon systématique (Chomette et al., 2006), en subdivisant le BAC 121 aviaire en plusieurs sous-parties (figure 60). Il n'a cependant pas été toujours possible de faire se chevaucher les extrémités des différents fragments testés et l'activité d'une

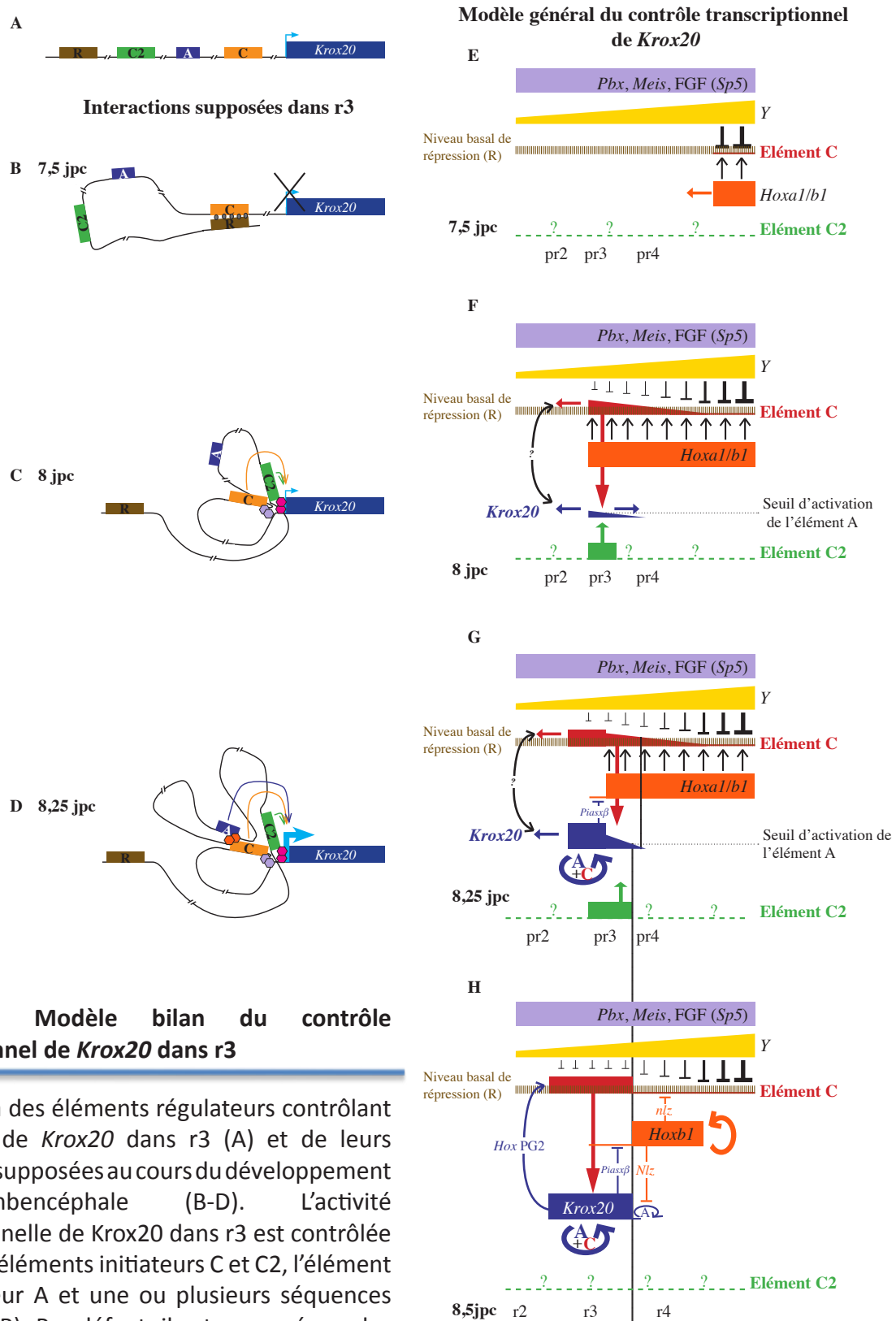


Figure 59. Modèle bilan du contrôle transcriptionnel de *Krox20* dans r3

A-D: Schéma des éléments régulateurs contrôlant l'expression de *Krox20* dans r3 (A) et de leurs interactions supposées au cours du développement du rhombencéphale (B-D). L'activité transcriptionnelle de *Krox20* dans r3 est contrôlée par les deux éléments initiateurs C et C2, l'élément autorégulateur A et une ou plusieurs séquences répressives (R). Par défaut, il est proposé que les séquences répressives maintiennent un niveau basal de répression en séquestrant l'élément C (B, les ovales grises représentent des facteurs répresseurs). À 8.0 jpc, des facteurs activateurs (hexagones mauves) libéreraient l'élément C de son interaction avec R et lui permettraient d'interagir avec le promoteur de *Krox20* et d'induire sa transcription. L'élément C2 est également impliqué dans le démarrage de l'expression de *Krox20* (C). L'élément C est ensuite nécessaire à l'activité de l'élément A en *cis*, potentiellement en participant à son recrutement au niveau du promoteur de *Krox20* (D).

E-H: Modèle général du contrôle transcriptionnel de *Krox20* dans r3 au cours du développement du rhombencéphale intégrant l'élément initiateur additionnel C2, le niveau basal de répression discuté en V.3, la coopération en *cis* entre l'élément C et l'élément A et l'expansion AP du territoire d'expression de *Krox20*.
 jpc : jours post-coïtum, pr : pré-rhombomère, r : rhombomère.

éventuelle région régulatrice située à la jonction entre deux fragments a pu passer inaperçue. Bien qu'il ait pu tout de même être identifié, l'élément C se trouvait par exemple dans cette situation, la partie initiale Cinit étant comprise dans le fragment #13 tandis que les séquences ajoutées pour former le nouvel élément Ccœur étaient situées sur le fragment #12 (figure 60). La région 12.3, conservée entre le poulet, les mammifères et le xénope sur environ 1 kb, est également située à la jonction entre deux fragments. Son profil de conservation suggère une implication potentielle dans la régulation de *Krox20* dans le rhombencéphale puisque seulement 8 autres séquences situées entre le locus *Nrbf2* et 35 kb* en amont de *Krox20* présentent un aussi grand degré de conservation et 3 d'entre elles correspondent aux éléments A, B et C. L'établissement d'une lignée transgénique de poisson portant cette région conservée en amont d'un gène rapporteur permettra de tester si elle possède une activité transcriptionnelle dans r3.

Le système de recombinaison méiotique ciblée ('tamere' pour « TArgeted MEiotic Recombination », Hérault et al., 1998) offre la possibilité d'exciser l'ensemble de la région comprise entre l'élément A et l'élément C chez la souris. Cette approche repose sur la recombinaison en *trans* de sites *Lox* situés sur des chromosomes homologues, en utilisant une lignée exprimant la protéine Cre dans les spermatocytes primaires. Au moment de la première division méiotique, l'appariement des chromosomes homologues va favoriser les occurrences de recombinaison induite par la Cre. Cette approche a été utilisée pour générer des délétions en série au niveau du locus *HoxD* (Tarchini et al., 2005; Montavon et al., 2011) ou pour exciser une région de 280 kb situées entre deux éléments régulateurs impliqués dans l'empreinte parentale sur la partie distale du chromosome 7 chez la souris (Lefebvre et al., 2009). La recombinaison entre les sites *Lox* situés au niveau des éléments A et C, éloignés de 70 kb chez la souris,

* : Le génome séquencé du poulet n'est pas entièrement assemblé et le gène *Krox20* et les régions voisines sur environ 50 kb n'apparaissent pas dans les données disponibles sur UCSC, ce qui complique nos études. C'est une limite d'autant plus contraignante que les séquences de poulet sont très utiles pour la recherche de régions conservées en amont du locus *Krox20*, la distance évolutive du poulet par rapport aux mammifères permettant à la fois de ne faire apparaître que les régions les plus importantes sans omettre les éléments déjà caractérisés (figure 60). La conservation avec le poisson-zèbre, par exemple, ne fait pas apparaître l'élément A bien que des données fonctionnelles et de récentes expériences dans le laboratoire suggèrent qu'il existe chez cette espèce. *Krox20* n'apparaît pas non plus sur les génomes des autres espèces d'oiseaux séquencés disponibles sur UCSC ni sur la dernière version du génome de poulet (galGal 4), publiée en Novembre 2011.

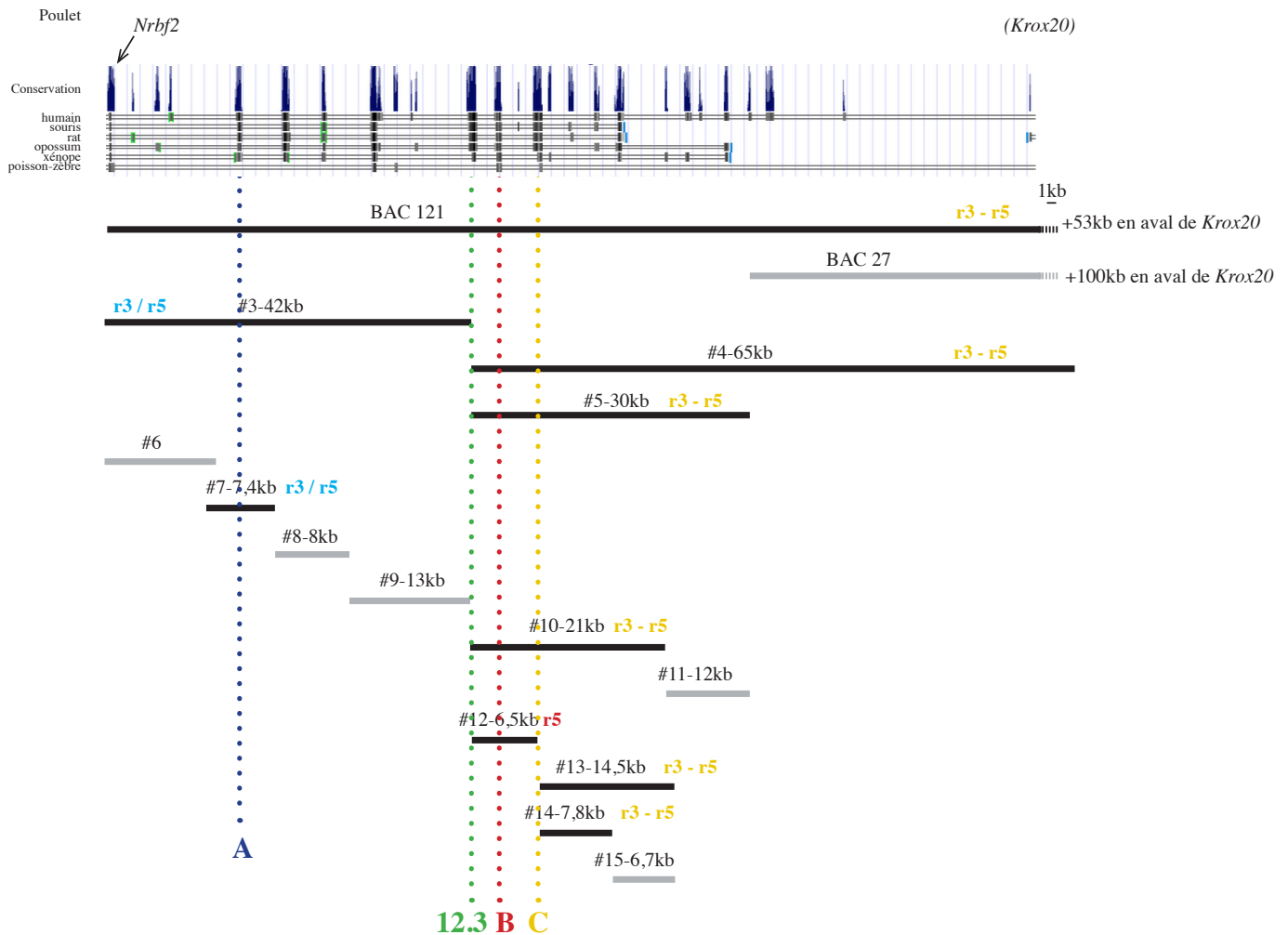


Figure 60. Schéma des fragments d'ADN dont l'activité transcriptionnelle a été testée par transgénèse murine

Les fragments testés sont figurés par des barres dont la taille est à l'échelle et au dessus desquelles sont indiqués les rhombomères où les fragments sont actifs. Les fragments transcriptionnellement inactifs sont en gris. En haut est représenté, sous forme d'histogramme, le profil de conservation correspondant aux séquences de poulet avec différents génomes de vertébrés. Les scores d'alignement par paire du génome aviaire avec chaque espèce est représenté par un graphe de densité horizontale. L'emplacement du locus *Nrbf2*, des éléments A, B et C, de la région conservée 12.3 et l'emplacement putatif du locus *Krox20* (voir note en fin de page) sont indiqués.

devrait donc être réalisable. L'utilisation de ce système est susceptible de nous renseigner sur trois points :

- le rôle de l'élément B dans r5 puisque la recombinaison entre les locus A et C (souris $Krox20^{\Delta A-C/\Delta A-C}$) entraînera sa délétion
- la présence de l'élément C2 entre A et C. Si l'expression de $Krox20$ dans les souris recombinées $Krox20^{\Delta A-C/\Delta A-C}$ ne démarre pas, cela suggérera que l'élément initiateur additionnel se trouve dans cette région.
- si au contraire l'expression de $Krox20$ chez les souris $Krox20^{\Delta A-C/\Delta A-C}$ est identique à celle des mutants $Krox20^{\Delta C/\Delta C}$, cela nous indiquera que l'élément C2 se trouve en dehors des 73 kb compris entre les éléments A et C. De plus, cela nous assurera que les séquences de l'élément C situées en 5', non excisées dans le mutant $Krox20^{\Delta C/\Delta C}$ (voir partie IV.I. dans les résultats), ne portent aucune activité transcriptionnelle résiduelle.

Enfin, il est également possible que l'élément C2 se situe en dehors du BAC 121, et du BAC 27 également testé lors de l'identification des éléments A, B et C (figure 60), qui recouvrent ensemble chez le poulet plus de 200 kb centrées autour du locus $Krox20$. Cela correspond à une région s'étendant depuis le locus $Nrbf2$ en 5' jusqu'au locus $Znf365$ en 3', soit environ 500 kb chez la souris. Bien qu'importante, cette distance est cohérente avec la très forte synténie montrée par les gènes situés autour de $Krox20$, dont l'ordre est très bien conservée entre les locus $Reep3$ et $Arid5b$ chez les mammifères, le lézard et le poisson-zèbre si l'on prend en compte la duplication récente de son génome (figure 61). Cette forte synténie peut découler de la présence d'éléments régulateurs de $Krox20$ situés au delà des séquences intergéniques comprises entre $Krox20$ et ses voisins directs et empêchant l'apparition au cours de l'évolution d'évènements de recombinaison. Chez la souris, cela correspond à une région de 1,2 Mb centrée sur $Krox20$ et sur laquelle pourraient être restreintes nos recherches dans un premier temps.

Afin d'identifier l'élément C2, une autre approche repose sur l'hypothèse qu'il puisse, comme l'élément C, être contrôlé par des facteurs Hox, Pbx et Meis puisqu'aucune expression de $Krox20$ n'est détectée dans le triple mutant $Hoxa1-Hoxb1-Hoxd1$ chez le Xénope (McNulty et al., 2005). Dans ce cas, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivi de séquençage haut-débit devraient

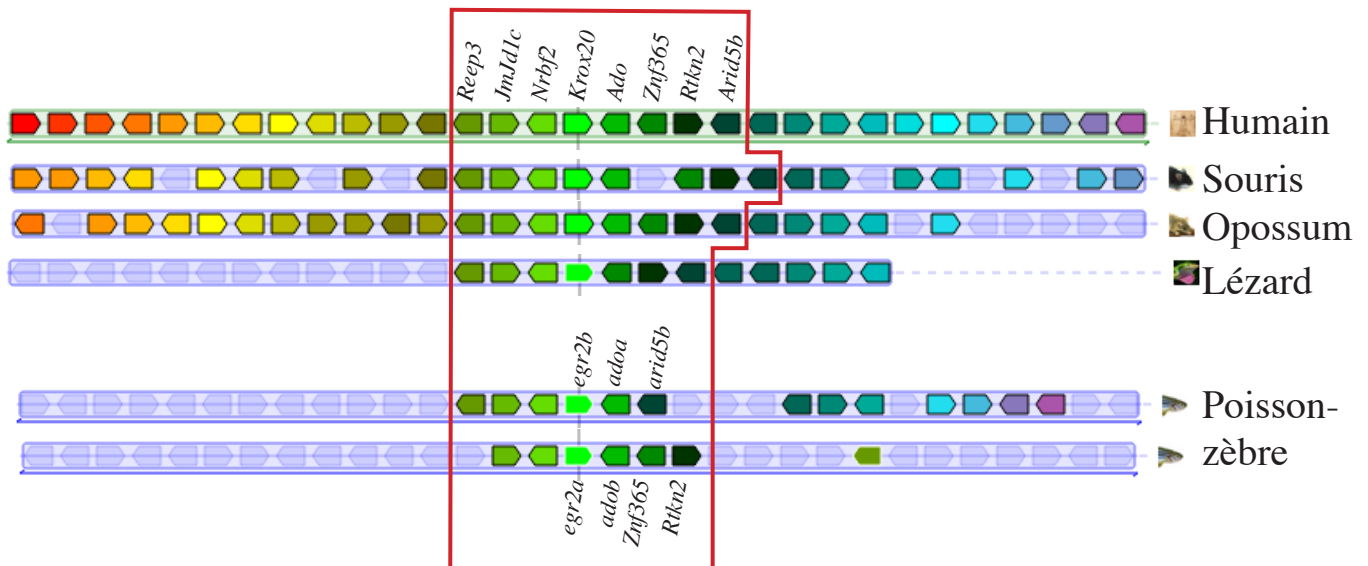


Figure 61. Représentation des gènes autour du locus *Krox20* chez différentes espèces de vertébrés.

Chaque gène est représenté de la même couleur chez les différentes espèces montrées. Les données montrent que la syntenie autour de *Krox20* est très bien conservée (cadre rouge) jusqu'aux locus *Reep3* en 5' et *Arid5b* en 3', et potentiellement plus loin. Le génome des téléostéens a été dupliqué récemment au cours de l'évolution, libérant la contrainte évolutive sur la séquence d'un des deux gènes dupliqués. Il est donc vraisemblable que les gènes *Znf365* et *Rtkn2* aient été perdus sur le chromosome 12, portant *egr2b* (homologue de *Krox20*), par dérive de leurs séquences sans remaniement important de la région puisque le gène *Arid5b*, et d'autres plus loin, sont présents en 5'. À noter : le gène *egr2a* est également exprimé dans r3 et r5 selon une dynamique similaire à *egr2b* (Sun et al., 2002).

Données obtenues à partir du serveur Genomicus (Muffato et al., 2010).

permettre d'identifier l'ensemble des régions d'ADN liées par ces facteurs. Si ce nombre n'est pas trop important dans l'intervalle synténique de 1,2 Mb, il suffira ensuite de tester l'activité transcriptionnelle portée par ces séquences.

Il est également possible de scanner la région synténique de 1,2 Mb à l'aide de BAC de poulet ou murins, comme cela a été fait pour identifier les éléments A, B et C. Toutefois la disponibilité de nombreux génomes séquencés d'une part, et de nouvelles données génomiques d'autre part, notamment grâce au projet ENCODE, rend possible un meilleur ciblage de notre approche. En effet, la localisation de régions intergéniques ou introniques conservées et enrichies en marques de chromatine spécifiques des enhancers, telles que H3K9Ac, H3K4me¹ ou la fixation du co-activateur p300, a permis de prédire avec une grande précision l'emplacement de régions régulatrices (revu ici : Hardison and Taylor, 2012). La marque H3K4me¹ est particulièrement utile puisqu'elle ne semble pas liée à l'activité de l'enhancer mais constituerait une signature chromatinienne présente dès les premiers stades de développement (voir introduction). Il est ainsi possible d'exploiter les données de ChIP-Seq étudiant sa distribution dans le génome indépendamment du stade ou du tissu où elles ont été obtenues. Illustrant la puissance de cette approche, nous avons récemment identifié une séquence du génome de poisson-zèbre correspondant probablement à l'élément A, dont le profil de conservation ne s'étend pas jusqu'au poisson (figure 60), en utilisant les données de ChIP-Seq disponibles depuis peu sur UCSC pour mettre en évidence une région enrichie localement en marques H3K4me¹, située entre *Nrbf2* et l'élément B, et dont nous avons ensuite testé l'activité transcriptionnelle. Ainsi, même si l'élément C2 n'est pas conservé entre les vertébrés, ces différents nouveaux outils devraient nous permettre de l'identifier et de poursuivre la caractérisation du contrôle transcriptionnel de *Krox20*.

ANNEXE

Hindbrain patterning requires fine-tuning of early *krox20* transcription by Sprouty 4

Charlotte Labalette^{1,2,3}, Yassine Xavier Bouchouha^{1,2,3}, Michel Adam Wassef^{1,2,3}, Patricia Anne Gongal^{1,2,3}, Johan Le Men^{1,2,3}, Thomas Becker⁴, Pascale Gilardi-Hebenstreit^{1,2,3} and Patrick Charnay^{1,2,3,*}

SUMMARY

Vertebrate hindbrain segmentation is an evolutionarily conserved process that involves a complex interplay of transcription factors and signalling pathways. Fibroblast growth factor (FGF) signalling plays a major role, notably by controlling the expression of the transcription factor *Krox20* (*Egr2*), which is required for the formation and specification of two segmental units: rhombomeres (r) 3 and 5. Here, we explore the molecular mechanisms downstream of FGF signalling and the function of Sprouty 4 (*Spry4*), a negative-feedback regulator of this pathway, in zebrafish. We show that precise modulation of FGF signalling by *Spry4* is required to determine the appropriate onset of *krox20* transcription in r3 and r5 and, ultimately, rhombomere size in the r3-r5 region. FGF signalling acts by modulating the activity of *krox20* initiator enhancer elements B and C; in r5, we show that this regulation is mediated by direct binding of the transcription factor MafB to element B. By contrast, FGF signalling does not control the *krox20* autoregulatory element A, which is responsible for amplification and maintenance of *krox20* expression. Therefore, early *krox20* transcription sets the blueprint for r3-r5 patterning. This work illustrates the necessity for fine-tuning in a common and fundamental patterning process, based on a bistable cell-fate choice involving the coupling of an extracellular gradient with a positive-feedback loop. In this mode of patterning, precision and robustness can be achieved by the introduction of a negative-feedback loop, which, in the hindbrain, is mediated by *Spry4*.

KEY WORDS: FGF, Segmentation, Rhombomere, Feedback loop, Zebrafish

INTRODUCTION

Vertebrate hindbrain morphogenesis has been the focus of intensive study as a model for vertebrate patterning. The establishment of hindbrain anteroposterior (AP) identity involves a transient segmentation, which leads to the formation of seven to eight metameres called rhombomeres (r) (Lumsden, 1990; Lumsden and Krumlauf, 1996). These territories constitute compartments and developmental units for neuronal differentiation, branchiomotor nerve organisation and neural crest specification (Lumsden and Keynes, 1989). The gene regulatory network underlying hindbrain segmentation includes several transcription factor genes that show spatially restricted patterns of expression along the AP axis, with limits corresponding to prospective or established boundaries between adjacent rhombomeres (Lumsden and Krumlauf, 1996). Among them, *Krox20* (also known as *Egr2*) is specifically expressed in r3 and r5 (Wilkinson et al., 1989) and has been shown to be essential for the establishment and specification of these rhombomeres (Schneider-Maunoury et al., 1993; Schneider-Maunoury et al., 1997; Swiatek and Gridley, 1993; Voiculescu et al., 2001). However, how relative rhombomere sizes are controlled, an essential issue related to many patterning and morphogenetic processes, has not been addressed.

Control of hindbrain segmentation involves several cell signalling pathways. Among them, Fibroblast growth factor (FGF) signalling is necessary in particular to promote *Krox20*-mediated r3 and r5 development (Aragon and Pujades, 2009; Marin and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2003; Wiellette and Sive, 2004). It has been shown in zebrafish and chick embryos that *Krox20* expression requires prior FGF signalling (Aragon and Pujades, 2009; Walshe et al., 2002). However, the molecular mechanisms of this regulation have not been investigated. Furthermore, despite the importance of FGF signalling in hindbrain patterning, its possible modulation by antagonists has not been analysed. A negative regulator of the FGF pathway, Sprouty (*Spry*; *Sty* – FlyBase), has been identified in *Drosophila* (Hacohen et al., 1998). *spry* is induced by FGF signalling and therefore functions as a negative-feedback regulator (Hacohen et al., 1998). *Spry* acts intracellularly, through inhibition of the Ras/MAPK pathway (Gross et al., 2001; Yusoff et al., 2002). Four vertebrate orthologues of *spry* have been identified. In mice, *Spry1*, *Spry2* and *Spry4* are widely expressed in the embryo, whereas *Spry3* expression is restricted to the adult (Minowada et al., 1999).

In this study, we have investigated the role of *Spry* genes in zebrafish hindbrain development and show that *Spry4* plays a key role in hindbrain patterning, controlling the relative size of odd- and even-numbered rhombomeres in the r3-r5 region. We demonstrate that *Spry4* sets the appropriate onset of *krox20* transcription in r3 and r5 by fine-tuning FGF control of *krox20* initiator enhancer elements. By contrast, *Spry4* and FGF signalling do not affect the activity of the *krox20* autoregulatory element responsible for the later amplification and maintenance of *krox20* expression. Therefore, the size of mature rhombomeres is determined at the onset of *krox20* expression, and this work

¹Ecole Normale Supérieure, IBENS, Paris Cedex 75230, France. ²Inserm, U1024, Paris Cedex 75230, France. ³CNRS, UMR 8197, Paris Cedex 75230, France. ⁴Brain and Mind Research Institute, Sydney Medical School, 100 Malet St, Camperdown NSW 2050, Australia.

*Author for correspondence (charnay@biologie.ens.fr)

presents a mechanism that combines negative and positive autoregulatory loops to achieve precise and robust pattern formation.

MATERIALS AND METHODS

In situ hybridisation

To generate a *spry1* probe, a cDNA was subcloned into the pCRII-TOPO vector, after RT-PCR using primers 5'-GAATTCGTCCTGTCCTG-GACCAG-3' and 5'-CTCGAGCTTTAACGCAGCCTTTCG-3'. For the *spry2* and *spry4* probes, the 3' UTR regions (IMAGE 7227962 and IMAGE 3719315, respectively) were subcloned into pBluescript (Stratagene). Other probes used were zebrafish *krox20* (Oxtoby and Jowett, 1993), chicken *Krox20* (Giudicelli et al., 2001), *ntl* (Schulte-Merker et al., 1994), *her5* (Muller et al., 1996), *mafba* (Moens et al., 1998), *fgf8* (Furthauer et al., 1997) and *hoxb1a* (Prince et al., 1998). Single and double whole-mount in situ hybridisations were performed as described (Hauptmann and Gerster, 1994).

Constructs and zebrafish lines

For all constructs, cloning junction and point mutations were verified by sequencing. The pCS2-*spry4* vector was obtained by subcloning the zebrafish *spry4* open reading frame into pCS2+ (RZPD). To generate the dominant-negative form of Spry4 (Spry4Y52A), a mutation of TAC (tyrosine) to GCC (alanine) was introduced at codon 52 (Sasaki et al., 2001) using the Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech). A morpholino-resistant *spry4* RNA was generated by introducing five silent mismatches into the morpholino target sequence: 5'-(C>G)AGATG-GA(G>A)TC(A>T)(A>T)GGGT(T>G)-3'. For electroporation in the chick neural tube, wild-type and dominant-negative *spry4* cDNAs were tagged with a sequence encoding an HA epitope (5'-TACCCATACGACG-TACCAGACTACGCATCG-3') just before the stop codon and subcloned into the pAdRSV vector (Wassef et al., 2008). Chicken elements A and B were cloned upstream of the *gfp* reporter in a modified pTol2 vector (Stedman et al., 2009). Chicken element C was cloned into pBGZ40 (Yee and Rigby, 1993) upstream of the minimal β -globin promoter-*gfp* reporter. The mutations in the MafB binding sites were introduced using the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Finnzymes) and/or the QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). To generate the *zB:gfp* construct, a 720 bp zebrafish element B (PCR amplified using primers 5'-GATATGCATGGTAAAATCTCCCACCATCG-3' and 5'-GCGCTC-GAGCACC GCCGAAAAACAATAGC-3') was cloned upstream of the *gfp* reporter in the modified pTol2 vector. Transgenic lines were obtained from embryos injected at the 1-cell stage with the pTol2 constructs together with *tol2 transposase* mRNA.

mRNA and morpholino injections

spry4 capped sense RNAs were obtained using the mMACHINE mMESSAGE Kit (Ambion) and 300 pg were injected at the 1-cell stage. The sequence of the *spry1* morpholino (Spry1mo) is 5'-CGCG-GAGATCCATAAGACACGATCA-3'. Morpholinos for *spry2* and *spry4* (Spry2mo and Spry4mo) have been described previously (Furthauer et al., 2001; Furthauer et al., 2004). A control *spry4* morpholino (Ctrlmo) was designed by introducing five mismatches into Spry4mo (5'-GTAA-CACTTGAATCGATCTGAAGGT-3'). Morpholinos (Gene Tools) were diluted in Danieau buffer and 2 pmoles were injected at the 1- to 4-cell stage.

Proliferation assay, phosphorylation analysis and SU5402 treatment

For proliferation assays, embryos were immunostained using a rabbit polyclonal antibody against phospho-Histone H3 (Upstate) and Alexa 488-coupled goat anti-rabbit IgG (Jackson). This analysis was preceded by fluorescent in situ hybridisation for *krox20* using FastRed substrate (Roche). Confocal optical sections of flat-mounted embryos were obtained with an inverted Leica DMIRE2 microscope. Western blot analysis was performed as described (Pezeron et al., 2008) using monoclonal phosphoERK (Cell Signaling), polyclonal ERK (Cell Signaling) and monoclonal β -actin (Sigma) antibodies. The phosphoERK and total ERK

levels on the immunoblots were quantified using ImageJ software (NIH). Polyclonal phosphoERK antibody (Cell Signaling) was used for whole-mount immunostaining. Treatment of embryos with 60 μ M SU5402 was performed as described (Walshe et al., 2002).

In ovo electroporation, X-gal staining and whole-mount immunostaining

In ovo electroporation of the chick neural tube, recovery of embryos and immunodetection were performed as previously described (Desmazières et al., 2009). GFP expression was detected using a rabbit polyclonal antibody (Molecular Probes). Fluorescent signals were quantified using ImageJ. X-gal staining was performed as described (Ghislain et al., 2003).

Gel retardation analysis

Band shift assays were performed with MafB protein purified from bacterial extracts as described (Manzanares et al., 2002). The following double-stranded oligonucleotides were used as probes or competitors: wtM1, 5'-GGAAAGTACAGACAGTGCATTTTCCC-3'; mutM1, 5'-GGAAAGGTAAGACAGTGCATTTTCCC-3'; wtM2, 5'-CAAATTGCTGATTTTACCAGTATC-3'; and mutM2, 5'-CAAATTGCATGATTTTACCAGTATC-3'.

RESULTS

Expression of the Sprouty gene family in the developing hindbrain

In the zebrafish embryo, expression of *spry1*, *spry2* and *spry4* has been reported in the midbrain-hindbrain region at mid-somitogenesis stages (Furthauer et al., 2001; Furthauer et al., 2002; Furthauer et al., 2004; Komisarczuk et al., 2008). To further analyse their expression, we performed an in situ hybridisation analysis starting from 80% epiboly. We found that these genes were expressed from 90% epiboly in a large transverse stripe of the neural plate, which is likely to correspond to the prospective hindbrain (data not shown). At 100% epiboly, *spry1* was still expressed in a broad band corresponding approximately to the hindbrain (Fig. 1A), whereas *spry2* and *spry4* showed more restricted AP patterns within the hindbrain (Fig. 1B,C). At the 1-somite stage, to evaluate the limits of the Spry gene expression domains, we performed double in situ hybridisations with *krox20*. At this stage, *krox20* expression is well established in r3, but is only beginning to be initiated in prospective r5. *spry1* was expressed from approximately r1 to r6 (Fig. 1D) and *spry2* from r1/r2 to r4 (Fig. 1E). In contrast to *spry1* and *spry2*, which were uniformly expressed in single domains, *spry4* showed strong expression in r2 and r3 and weaker expression in r4 and r5 (Fig. 1F). At the 4- to 6-somite stages, *spry1* and *spry2* were highly expressed in r1, ventral r2 and r4, and in the midbrain-hindbrain boundary (MHB) (Fig. 1G,H,J,K). By contrast, *spry4* expression became prominent in r3, r5 and the MHB (Fig. 1I,L).

Spry4 controls hindbrain patterning in the r3-r5 region

To investigate the effects of Spry loss-of-function on hindbrain patterning, we performed knockdown experiments with morpholino oligonucleotides. We used morpholinos that had been previously tested: Spry1mo (Marika Kapsimali, personal communication), Spry2mo (Furthauer et al., 2004) and Spry4mo (Furthauer et al., 2001). As a control we used a version of Spry4mo containing five mismatches (Ctrlmo). To evaluate the consequences of morpholino injections, we first performed double in situ hybridisations at the 10-somite stage for *krox20* and *her5*, a marker of the MHB. Spry1mo-injected embryos ($n=23$) did not show any obvious phenotype (Fig. 2A,B). Spry2mo induced a lateral broadening of the neural plate and a shortening of the AP axis

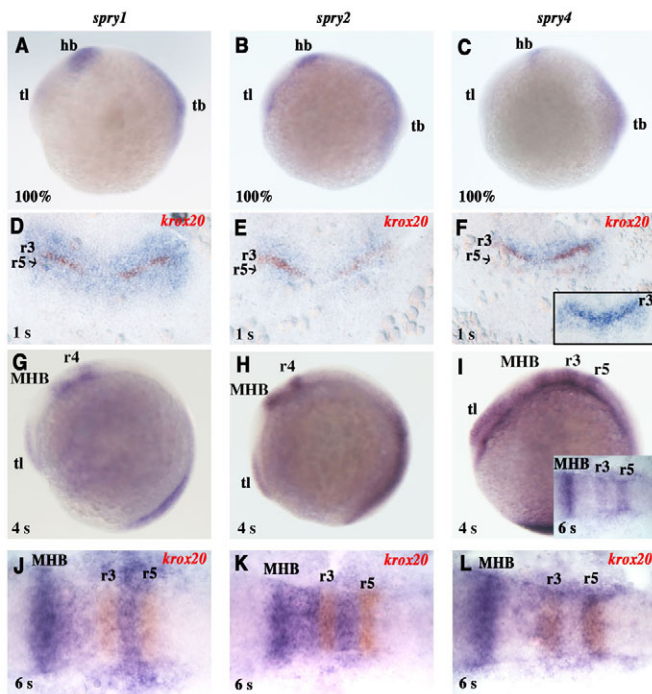


Fig. 1. Spry gene expression in the early zebrafish hindbrain. (A-L) In situ hybridisations were performed with *spry1* (A,D,G,I), *spry2* (B,E,H,K) and *spry4* (C,F,I,L) probes (blue) at the indicated somite (s) or epiboly (%) stages, shown as lateral views with anterior to the left (A-C,G-I) and flat-mounts with anterior at the top (D-F) or left (inset in J and L). Where indicated (D-F,J-L), double in situ hybridisation was performed with a *krox20* probe (red) to allow precise localisation of r3 and r5. The inset in F shows the *spry4* pattern without *krox20* labelling. hb, hindbrain; tb, tailbud; tl, telencephalon; MHB, midbrain-hindbrain boundary.

($n=22$; Fig. 2C). These malformations might result from dorsalisations and/or convergent-extension defects, as previously described (Furthauer et al., 2004). As expected (Furthauer et al., 2001), similar malformations were observed in Spry4mo-injected embryos (Fig. 2D). The severity of these morphological defects was comparable between Spry2 and Spry4 morphants (for quantification, see Fig. S1 in the supplementary material). However, Spry4mo injection resulted in an additional phenotype, with a dramatic reduction of the area of r4, often resulting in a partial fusion of r3 and r5 territories (Fig. 2D). Co-injection of the Spry4mo with a p53 morpholino (Robu et al., 2007) resulted in the same change in hindbrain patterning, excluding an artefact of morpholino-induced cell death (see Fig. S2 in the supplementary material). These modifications did not lead to any overlap between r3/r5 and r4 markers as revealed by double in situ hybridisation with *krox20* and *hoxb1a* probes (Fig. 2F,G).

Quantification of the areas of individual rhombomeres, after normalisation to the area of the r1-r5 territory, revealed a 55% decrease in the area of r4 in Spry4mo-injected embryos ($n=18$) as compared with controls ($n=12$; t -test, $P<0.0001$; Fig. 2H). By contrast, the r1/r2 territory was only decreased by 15% in Spry4 morphants (t -test, $P<0.004$) (Fig. 2H). The specific reduction in the

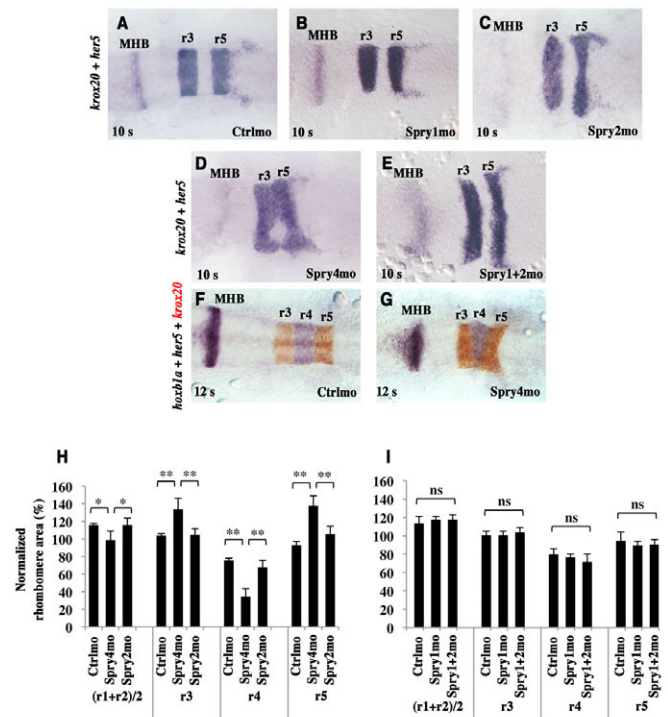


Fig. 2. Spry4 loss-of-function results in hindbrain patterning defects. (A-G) Zebrafish embryos injected with either control morpholino (Ctrlmo) (A,F), Spry1mo (B), Spry2mo (C), Spry4mo (D,G) or both Spry1mo and Spry2mo (E) were collected at the 10-somite (A-E) or 12-somite (F,G) stage and subjected to in situ hybridisation for *krox20* and *her5*, a marker of the MHB (A-E, both purple), or for *krox20* (red), *her5* and *hoxb1a* (purple) (F,G). Embryos are flat-mounted with anterior to the left. (H,I) Quantitative evaluation of rhombomere areas.

Normalised areas were obtained by dividing each rhombomere area by one fifth of the area of the neural plate from r1 to r5. ns, not significant ($P>0.05$); *, $P<0.004$; **, $P<0.0001$; Student's t -test. Error bars indicate s.e.m.

r4 area in Spry4 morphants coincided with increases in the areas of r3 and r5 (by 29% and 48%, respectively; t -test, $P<0.0001$; Fig. 2H), suggesting that these rhombomeres had expanded at the expense of r4. No such differences in r3, r4 and r5 areas were observed in Spry1 or Spry2 morphants (Fig. 2H,I). As the Spry1 and Spry2 amino acid sequences are more closely related to each other than to that of Spry4, these proteins might have redundant functions. We therefore evaluated the consequences of combined Spry1 and Spry2 loss-of-function. Although co-injected embryos appeared highly laterally broadened, no significant change in the relative area of the rhombomeres was observed ($n=25$; Fig. 2E,I). Altogether, these data demonstrate that Spry4 loss-of-function specifically results in an expansion of r3 and r5, presumably at the expense of r4, and that it is unlikely that these effects are related to the morphological broadening phenotype.

We then investigated whether this mispatterning of the hindbrain persisted at later stages. At the 20-somite stage, rhombomere boundaries are well established and the formation of the neural rod is complete. In Spry4mo-injected embryos ($n=18$), the r4 area was reduced by 53%, as compared with control embryos ($n=12$; t -test, $P<0.0001$; see Fig. S3 in the supplementary material). Conversely, r3 and r5 areas were increased by 28% and 37%, respectively, as

compared with controls (t -test, $P < 0.0001$; see Fig. S3 in the supplementary material). The specificity of the phenotype was confirmed by RNA rescue experiments. For this purpose, *Spry4mo* was co-injected with a full-length *spry4* mRNA that contained silent mutations in the morpholino target sequence. In *Spry4* morphants co-injected with this mRNA ($n=18$), the reduction of the r4 area (by 11%) and the extensions of r3 and r5 (by 10% and 11%, respectively) were much milder than without co-injection (see Fig. S3 in the supplementary material), indicating that the phenotype associated with the *Spry4mo* was largely rescued by *spry4* mRNA and is therefore specific. Altogether, these data establish that *Spry4* loss-of-function results in a permanent expansion of the r3 and r5 territories and in a commensurate reduction of r4.

Spry4 does not regulate cell proliferation

The differential expansion of r3/r5 and r4 in embryos associated with *Spry4* loss-of-function might have resulted from abnormalities in the rates of cell proliferation. We investigated whether *Spry4* loss-of-function differentially affected cell proliferation during early somitogenesis. We identified cells in mitosis by immunostaining with an antibody directed against phospho-Histone H3 in control ($n=17$) and *Spry4mo*-injected ($n=23$) embryos at the 5-somite stage. The immunostaining was combined with *krox20* mRNA detection by fluorescent in situ hybridisation to localise r3 and r5. No significant changes in the distribution of mitotic cells were observed in r3, r4 or r5 upon *Spry4* knockdown (see Fig. S4 in the supplementary material). Thus, the relative expansion of r3 and r5 with respect to r4 cannot be explained by differential cell proliferation.

Spry4 modulates the onset of *krox20* expression

The expansion of r3 and r5 and the corresponding reduction of r4 in *Spry4* morphants might occur during the growth of the rhombomeres or result from very early cell-fate decisions. To address this, we investigated whether *Spry4* loss-of-function affected the early expression of *krox20*. To precisely stage embryos, we performed double in situ hybridisations for *krox20* and *no tail* (*ntl*). *ntl* is expressed in the germ ring and can be used to precisely evaluate the extent of tailbud closure (Fig. 3A-C, insets). In control embryos at the 100% epiboly stage, expression of *krox20* was observed in 46% of the embryos in r3, but never at the level of prospective r5 ($n=24$; Fig. 3A,D). By contrast, all *Spry4mo*-injected embryos expressed *krox20* in r3 and in a larger territory than in the controls ($n=27$; Fig. 3B,D). Furthermore, 22% of *Spry4* morphants also expressed *krox20* in r5. This phenotype was specific to *Spry4* as it did not occur in *Spry2mo*-injected embryos (20% expressed *krox20* in r3 and none expressed *krox20* at the level of r5; $n=20$; Fig. 3C,D). Similarly, *Spry1* or double *Spry1*;*Spry2* morphants did not show any detectable change in *krox20* expression compared with controls (data not shown). The specificity of this phenotype in *Spry4* morphants was confirmed by rescue experiments. As shown in Fig. 3E, the phenotype was strongly reduced by co-injection of *spry4* mRNA. Thus, *Spry4* loss-of-function leads to both premature *krox20* expression and larger early expression domains.

To further investigate the timing of this premature *krox20* expression, we examined earlier stages. At the 95% epiboly stage, all *Spry4* morphants expressed *krox20* in r3 and 4% already showed expression at the level of prospective r5 ($n=28$; Fig. 3D). By contrast, *krox20* expression was detected at the level of r3 in only 27% of control and 10% of *Spry2mo*-injected embryos ($n=26$ and $n=42$, respectively; Fig. 3D). At the 90% epiboly stage, neither

control ($n=28$) nor *Spry2mo*-injected ($n=40$) embryos displayed *krox20* expression (Fig. 3D). By contrast, 40% of the *Spry4mo*-injected embryos already expressed *krox20* at the level of prospective r3 ($n=40$; Fig. 3D).

To confirm these data, *krox20* expression was investigated following injection of an mRNA encoding a dominant-negative form of *Spry4* (*Spry4Y52A*) (Sasaki et al., 2001), which is another approach to obtain loss-of-function. At the 95% epiboly stage, 70% of *spry4Y52A* mRNA-injected embryos showed *krox20* expression in r3 ($n=36$), in contrast to only 20% of *gfp* mRNA-injected control embryos ($n=50$; Fig. 3F). Therefore, consistent with the morpholino experiments, injection of the dominant-negative RNA results in premature and expanded *krox20* expression in r3.

Finally, we investigated whether we could obtain phenotypes converse to those of the loss-of-function experiments by *Spry4* gain-of-function. For this purpose, we injected embryos with *spry4* mRNA. As shown in Fig. 3E, at 100% epiboly only 13% of the *spry4* mRNA-injected embryos ($n=23$) showed expression of *krox20* in r3, as compared with 43% of the *gfp* mRNA-injected controls ($n=21$; χ^2 -test, $P < 0.05$). *krox20* expression in r5 was also affected by the misexpression of *spry4*. At 10.25 hours post-fertilisation (hpf) 73% of the *gfp* mRNA-injected embryos expressed *krox20* in r5 ($n=26$) as compared with only 37% of the *spry4* mRNA-injected embryos ($n=27$; χ^2 -test, $P < 0.05$; Fig. 3G). These data indicate that *spry4* overexpression delays the onset of *krox20* expression, an effect opposite to that of *Spry4* loss-of-function.

In conclusion, our results indicate that *Spry4* modulates the onset and early expansion of *krox20* expression. This early phenotype correlates with the expansion of r3 and r5 territories at later stages, suggesting that early *krox20* expression is a critical determinant of the patterning of the r3-r5 region.

The onset of *krox20* expression is determined by FGF signalling

Our data indirectly implicated FGF signalling in the onset of *krox20* expression. To confirm that modulations of *Spry4* activity resulted in modifications at the level of FGF signalling, we analysed activation of the ERK pathway, which is known to require FGF signalling (Aragon and Pujades, 2009; Roy and Sagerstrom, 2004). Control and *Spry4mo*-injected embryos were collected at 100% epiboly and western blot analysis was performed on whole embryo protein extracts, using an antibody against phosphorylated (p) ERK1/2 (Mapk3/1 – Zebrafish Information Network), a read-out of ERK pathway activation. The pERK1/2 level, normalised to total ERK1/2, was increased in *Spry4* morphants (see Fig. S5 in the supplementary material). To reveal FGF signalling in situ, we performed whole-mount immunostaining against pERK1/2 and in situ hybridisation for a target of the pathway, *pea3*. pERK1/2 and *pea3* were detected in the hindbrain, and, in *Spry4* morphants, their expression levels were higher (see Fig. S5 in the supplementary material). Together, these data indicate that *Spry4* loss-of-function leads to enhanced FGF signalling, consistent with *Spry4* acting as an antagonist of this pathway.

Previous studies have revealed that *krox20* expression at mid- and late somitogenesis stages is dependent on prior FGF signalling (Marin and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wielllette and Sive, 2003). However, the role of the pathway has not been examined at early stages of *krox20* expression. To directly investigate this, we treated embryos with SU5402, an inhibitor of FGF receptor activity, from 50% epiboly. We first checked that this treatment prevented expression of *spry4* at the 100% epiboly stage

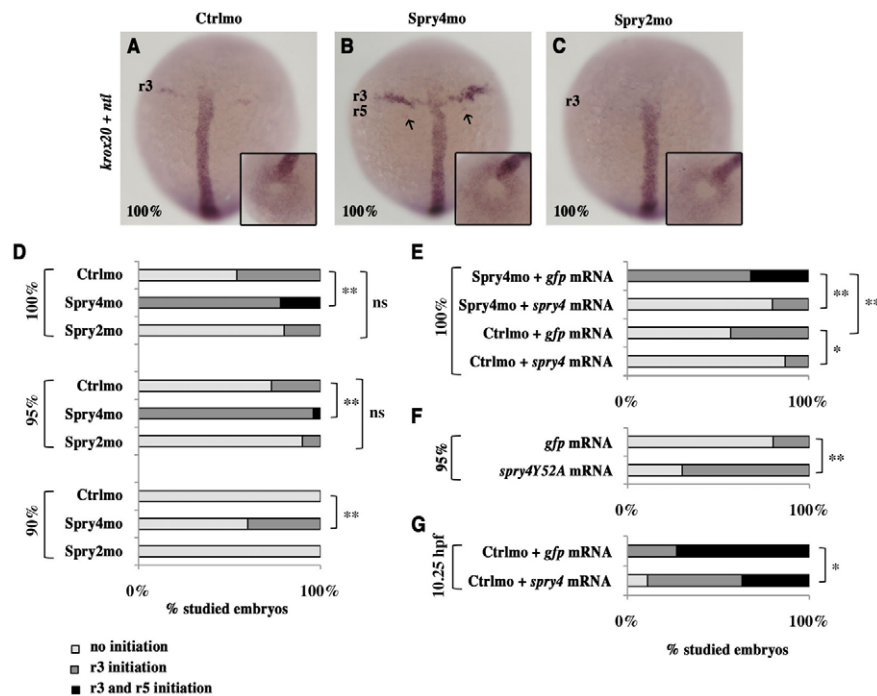


Fig. 3. Spry4 controls the onset of *krox20* expression. (A–C) Zebrafish embryos injected with either control morpholino (Ctrlmo) (A), Spry4mo (B) or Spry2mo (C) were collected at 100% epiboly and subjected to in situ hybridisation with *krox20* and *ntl* probes (purple). Arrows in B indicate *krox20* expression in a few r5 cells. The insets show tailbud views of the embryos, allowing determination of the developmental stage by evaluation of the closure of the tailbud, as revealed by *ntl* expression. (D–G) Distribution of embryos showing either no *krox20* expression, limited expression in r3 or expression in both r3 and r5 at 90, 95 or 100% epiboly or at 10.25 hours post-fertilisation (hpf). ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.0001$; χ^2 -test.

in the hindbrain (see Fig. S6 in the supplementary material), establishing that Spry4 is indeed part of a negative-feedback loop. At 10.25 hpf, only 63% of the SU5402-treated embryos ($n=19$) expressed *krox20* in r3, as compared with 95% of the control embryos ($n=22$; χ^2 -test, $P < 0.0001$; Fig. 4A,B,E), which in addition showed larger *krox20* expression domains. Furthermore, none of the embryos treated with SU5402 expressed *krox20* in r5, as compared with 50% of the control embryos at this stage. A defect at the level of r5 was still observed at 10.5 hpf (1-somite stage), with no *krox20* expression in SU5402-treated embryos ($n=28$; χ^2 -test, $P < 0.0001$; Fig. 4C,D,E).

These data were confirmed by an alternative approach. A stable transgenic line that expresses a heat shock-inducible dominant-negative form of Fgfr1 (Lee et al., 2005) was used to downregulate FGF signalling. Expression of the dominant-negative receptor was induced at the 80% epiboly stage and embryos were collected at 10.25 hpf. At this stage, *krox20* was expressed at the level of r3 in 94% of the non-transgenic embryos ($n=72$), in contrast to only 64% of *hsp70l:dnfgfr1-gfp* transgenic embryos ($n=74$; χ^2 -test, $P < 0.0001$; data not shown). Overall, these results establish that FGF signalling is essential for the normal onset of *krox20* expression in r3 and r5.

FGF signalling controls initiator but not maintenance *krox20* enhancers

Krox20 transcription in r3 and r5 is subject to two regulatory phases controlled by distinct cis-acting regulatory elements (Chomette et al., 2006; Wassef et al., 2008). Transcription is first induced in a cell under the control of initiator enhancers (element C in r3 and elements B and C in r5) leading to the early accumulation of Krox20 protein (the onset phase); this protein can then activate a positive autoregulatory loop by binding to a third enhancer, element A (the amplification and maintenance phase). Our observations of the consequences of the modulation of FGF signalling on early *krox20* expression suggest that this pathway might be required during the onset phase. To test this, we performed the SU5402 treatment on embryos carrying a point mutation in the *krox20* coding sequence that inactivates the protein

and therefore prevents the establishment of the autoregulatory loop [*krox20*^{fh227/fh227} (Monk et al., 2009)]. We found that at the 4-somite stage, the *krox20*-positive territories (corresponding only to the onset phase in the homozygous mutants) were dramatically reduced in SU5402-treated, as compared with DMSO carrier-treated, mutant embryos, as was the case for wild-type embryos (Fig. 4F–I). This definitively demonstrates that FGF signalling affects the onset phase of *krox20* expression.

To investigate whether FGF signalling was acting on *Krox20* at the transcriptional level, we analysed the dependence of the different cis-acting regulatory elements on FGF signalling. We first made use of a chick hindbrain electroporation system that we have shown previously to largely reflect the in vivo activities of the enhancers (Chomette et al., 2006). Constructs in which a GFP reporter is driven by each of the *Krox20* chick enhancers were co-electroporated with expression vectors for wild-type or dominant-negative (Spry4Y52A) HA-tagged forms of Spry4 to modulate FGF signalling. The level of endogenous *Krox20* expression was not affected after electroporation of wild-type ($n=14$; Fig. 5A,B, compare left and right) or Y52A ($n=17$; Fig. 5C,D) Spry4 at the 7- to 8-somite stage [Hamburger-Hamilton (HH) stage 9]. This suggests that endogenous *Krox20* expression is no longer sensitive to FGF signalling at this stage, consistent with previous observations (Aragon and Pujades, 2009). By contrast, co-electroporation with the enhancer constructs revealed that the activities of both the B and C enhancers were significantly reduced when co-electroporated with the wild-type Spry4 construct as compared with the dominant-negative form (59% and 63% reduction, respectively; $n=17$; Fig. 5I–P,R,S). It should be noted that we used a version of element C that contains additional sequences compared with the previously published enhancer (Chomette et al., 2006). This results in a higher specificity of the enhancer for r3 (data not shown). In contrast to its effect on the initiator elements, alteration of FGF signalling had no effect on enhancer A activity (Fig. 5E–H,Q). In conclusion, these data indicate that elements B and C, which are responsible for the onset of *krox20* transcription, are controlled by FGF signalling, whereas element A, which is in charge of the amplification and maintenance phase, is not.

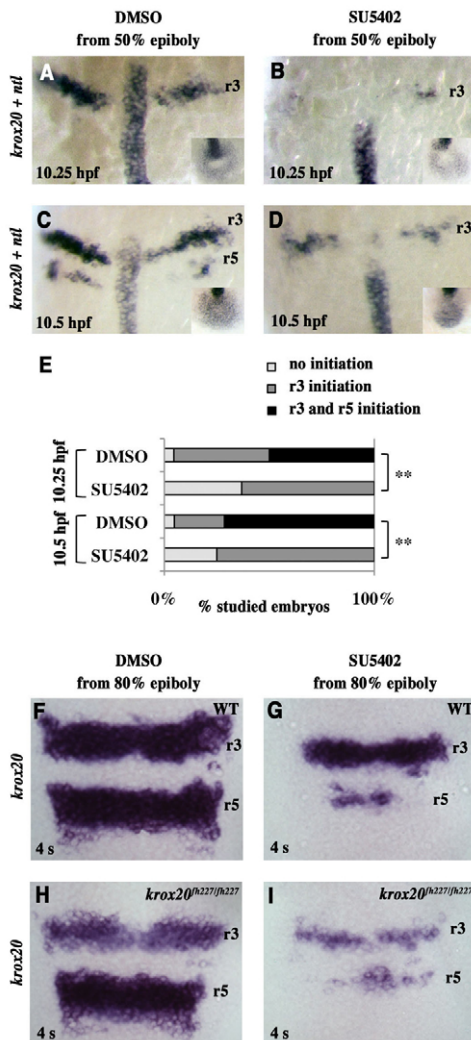


Fig. 4. FGF signalling is required for the appropriate onset of *krox20* expression. (A-D,F-I) Zebrafish embryos were incubated in either DMSO carrier or SU5402 from 50% epiboly to 10.25 hpf (A,B) or from 50% epiboly to the 1-somite stage (10.5 hpf) (C,D) or from 80% epiboly to the 4-somite stage (F-I) and analysed by in situ hybridisation for *krox20* and *ntl* (A-D) or for *krox20* alone (F-I). The insets in A-D show tailbud views of the corresponding embryos (see Fig. 3). Wild-type (WT) and *krox20*^{fh227/fh227} mutant embryos are compared in F-I. (E) Distribution of the embryos according to *krox20* expression in r3 and r5 (see Fig. 3). **, $P < 0.0001$; χ^2 -test.

To test whether these findings are also applicable to zebrafish, we generated stable transgenic lines carrying a *gfp* reporter under the control of chick element A (*cA*; zebrafish element A has not yet been identified) or zebrafish element B (*zB*). Transgenic embryos were exposed to SU5402 or DMSO carrier from the 1- to 8-somite stages, then fixed and analysed by double in situ hybridisation for *gfp* and *krox20*. In *cA:gfp* transgenic embryos, *gfp* expression always precisely overlapped with *krox20* expression in both r3 and r5, even after SU5402 treatment, which led to a reduction in the size of the r5 territory ($n=16$ and $n=19$, respectively; Fig. 6A,B). This suggests that the activity of element A is not affected by FGF signalling (the reduction in the

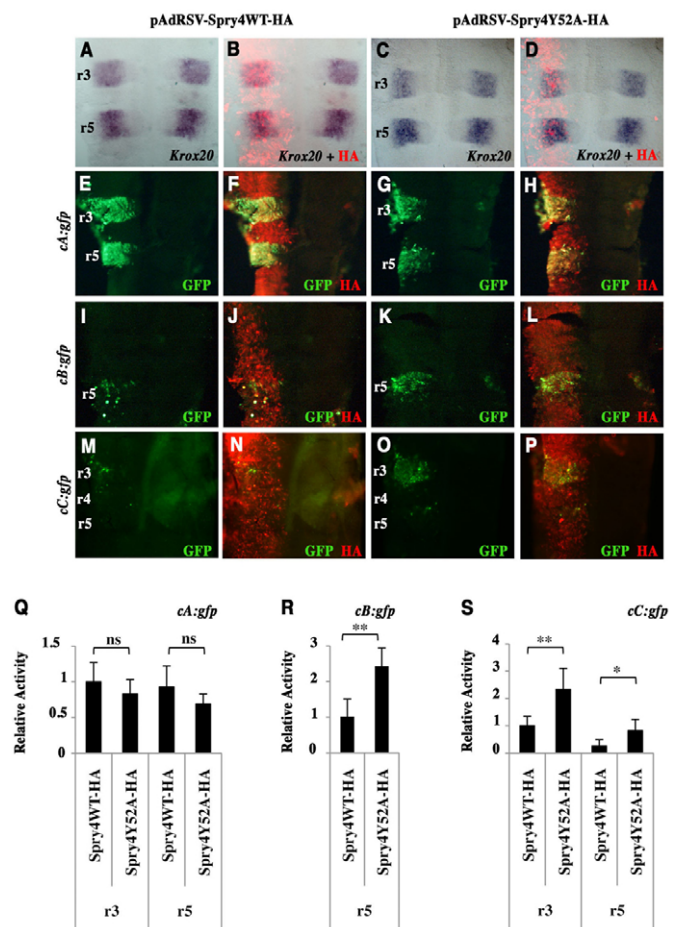


Fig. 5. *Spry4* regulates *Krox20* initiator enhancers in the chick embryo. (A-D) Chick embryo neural tubes were electroporated on the left side with HA-tagged wild-type or Y52A dominant-negative zebrafish *spry4*-expressing vectors (pAdRSV-*Spry4*WT-HA and pAdRSV-*Spry4*Y52A-HA), and flat-mounted after in situ hybridisation with a *Krox20* probe. No difference was detected between the left (experimental) and right (control) sides. The efficiency of electroporation and *spry4* expression were monitored by immunolabelling against the HA tag (B,D). (E-P) Chick embryo neural tubes were co-electroporated with HA-tagged wild-type or Y52A dominant-negative *spry4*-expressing vectors and constructs carrying chicken *Krox20* enhancer elements *cA*, *cB* or *cC* driving the *gfp* reporter, and subjected to HA (red) and GFP (green) immunostaining (merge in yellow). (Q-S) Quantitative evaluation of relative reporter activity obtained by dividing the GFP signal intensity by the HA signal intensity, both quantified using ImageJ. ns, not significant; *, $P < 0.0005$; **, $P < 0.0001$; Student's *t*-test. Errors bars indicate s.e.m.

r5 domain of A activity is likely to reflect the consequences of a lack of initiation of *krox20* expression). In *zB:gfp* transgenic embryos, *gfp* expression was restricted to r5 as expected in DMSO-treated control embryos ($n=14$), and was almost entirely absent from the remaining r5 territory after SU5402 treatment ($n=15$; Fig. 6C,D), indicating that element B absolutely requires FGF signalling for its activity.

Together, these chick and zebrafish experiments establish that FGF signalling controls *Krox20* transcription by regulating its onset phase through elements B and C. By contrast, the amplification and maintenance phase, controlled by element A, is not dependent on FGFs. This latter point explains why endogenous *Krox20*

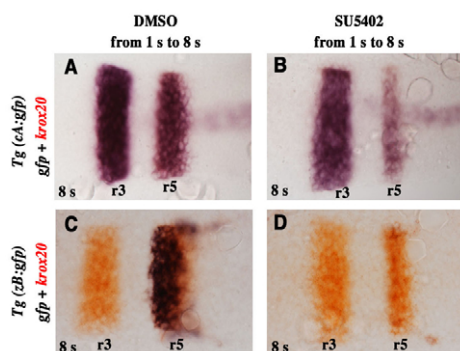


Fig. 6. FGF signalling is required for *krox20* enhancer B activity in the zebrafish embryo. (A–D) Transgenic embryos carrying the *gfp* gene under the control of the chicken *Krox20* A enhancer [*Tg(cA:gfp)*] (A,B) or the zebrafish *krox20* B enhancer [*Tg(zB:gfp)*] (C,D) were incubated in DMSO carrier (A,C) or SU5402 (B,D) from the 1-somite stage, collected at the 8-somite stage and subjected to double in situ hybridisation for *gfp* (blue) and *krox20* (orange); overlap is purple (A–C). Embryos were flat-mounted with anterior to the left.

expression is not sensitive (chick) or only partially sensitive (zebrafish) to a block in FGF signalling when the autoregulatory loop has become engaged.

MafB mediates FGF signalling by direct binding to element B

Since the effect of FGF signalling on *Krox20* expression in r5 is at least in part mediated by element B, we searched for the trans-acting factors involved. The transcription factor MafB, which is encoded in zebrafish by *mafba*, is necessary for *Krox20* expression in r5 (Cordes and Barsh, 1994; Moens et al., 1996; Wiellette and Sive, 2003). MafB expression requires FGF signalling (Aragon and Pujades, 2009; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2003; Wiellette and Sive, 2004). We investigated the dynamics of *mafba* expression and found that *Spry4* loss-of-function led to the premature onset of *mafba* in r5/r6: at 95% epiboly, all *Spry4* morphants expressed *mafba* ($n=28$), versus only 12% of control embryos ($n=33$; χ^2 -test, $P<0.0001$; see Fig. S7 in the supplementary material). These data raise the possibility that the premature onset of *krox20* expression in r5 is due to precocious activation of *mafba*.

To investigate whether MafB directly controls element B, we searched for potential MafB binding sites within enhancer B sequences conserved in vertebrate species. We found two motifs similar to the consensus MafB recognition element (MARE), termed MafB-1 and MafB-2 (Fig. 7A,B). The MafB-1 sequence is conserved between zebrafish, *Xenopus*, chick and mouse (Fig. 7A) and is followed by a sequence of lower similarity to MARE in reverse orientation (Fig. 7A). MafB-2 is well conserved between *Xenopus*, chicken and mouse enhancers, but was not found in the zebrafish enhancer at this position (Fig. 7A), although an identical sequence is present in zebrafish at a more 5' position. Interestingly, MafB-2 is located close to a vHnf1 (Hnf1ba – Zebrafish Information Network) binding site (Fig. 7A) that we have previously shown to be required for element B activity in r5 (Chomette et al., 2006). We investigated whether MafB interacts with the two putative binding sites by gel retardation. Incubation of oligonucleotides carrying each sequence (Fig. 7A) with

bacterially expressed mouse MafB led to the formation of specific retarded bands (Fig. 7C). To establish that the binding sites corresponded to the sequences identified in silico, we introduced mutations into the putative MafB sites (Fig. 7B). Band shift analysis demonstrated that the affinity of MafB was strongly reduced for the mutated MafB-1 oligonucleotide and abolished for the mutated MafB-2 oligonucleotide (Fig. 7C). In the former case, residual binding might be due to the presence of the related sequence in reverse orientation, which was also present in the oligonucleotide.

To investigate the functional significance of these binding sites in the enhancer, we compared the activities of wild-type and mutant versions of chick element B driving the *lacZ* reporter in the chick electroporation system. Wild-type enhancer activity was restricted to r5 as expected (Fig. 7D). Mutation of the MafB-1 or MafB-2 site strongly reduced the activity of element B (Fig. 7E,F) and the double mutation abolished it (Fig. 7G). This demonstrated that both sites are important for enhancer activity. To investigate the ability of MafB to activate the enhancer via these sites and to cooperate with vHnf1, we performed co-electroporation experiments. Co-electroporation of the wild-type enhancer with MafB or vHnf1 expression vectors led to slight expansions of the domain of enhancer activity (Fig. 7H,I). However, co-electroporation with both expression vectors led to generalised and high-level activation of the enhancer throughout the neural tube (Fig. 7J). By contrast, almost all activity was abolished when the enhancer carried mutations in both MafB sites (Fig. 7K) or in the vHnf1 binding site (data not shown). Finally, we analysed endogenous chick *Krox20* expression upon ectopic expression of *MafB*, *vHnf1* or both, and it responded in a manner similar to element B, although the ectopic activation was more limited (see Fig. S8 in the supplementary material).

In conclusion, this analysis establishes that in r5, MafB activates element B and therefore *Krox20* expression by direct binding to the MafB-1 and MafB-2 sites, and that it synergistically cooperates with vHnf1 bound to its nearby cognate site. Since MafB is itself under FGF (Wiellette and Sive, 2003) and *Spry4* (this study) control, this demonstrates that in r5, *Krox20* regulation by the FGF pathway and fine-tuning by *Spry4* involve direct transcriptional control by MafB.

DISCUSSION

In this study, we have investigated FGF-dependent mechanisms that control the size of rhombomeres during zebrafish hindbrain development. We have established the role of a negative-feedback regulatory loop governed by *Spry4*, which fine-tunes FGF signalling to control early *krox20* transcription and the subsequent expansion of r3, r4 and r5. The tight correlation between these two processes suggests a direct causative link between them. We propose that fine-tuning, negative-feedback regulation and positive autoregulation can combine at the molecular level to ensure robust and precise patterning.

FGF signalling controls early *krox20* transcription

Previous studies have shown that FGF signalling plays an essential role in the control of *Krox20* expression in r3 and r5 (Aragon and Pujades, 2009; Marin and Charnay, 2000; Maves et al., 2002; Walshe et al., 2002; Wiellette and Sive, 2003; Wiellette and Sive, 2004). Here we investigated the timing, the level of action and the mechanisms of FGF control. We had previously shown that *krox20* is initially transcribed under the control of two initiator cis-acting regulatory elements: C in r3 and r5 and

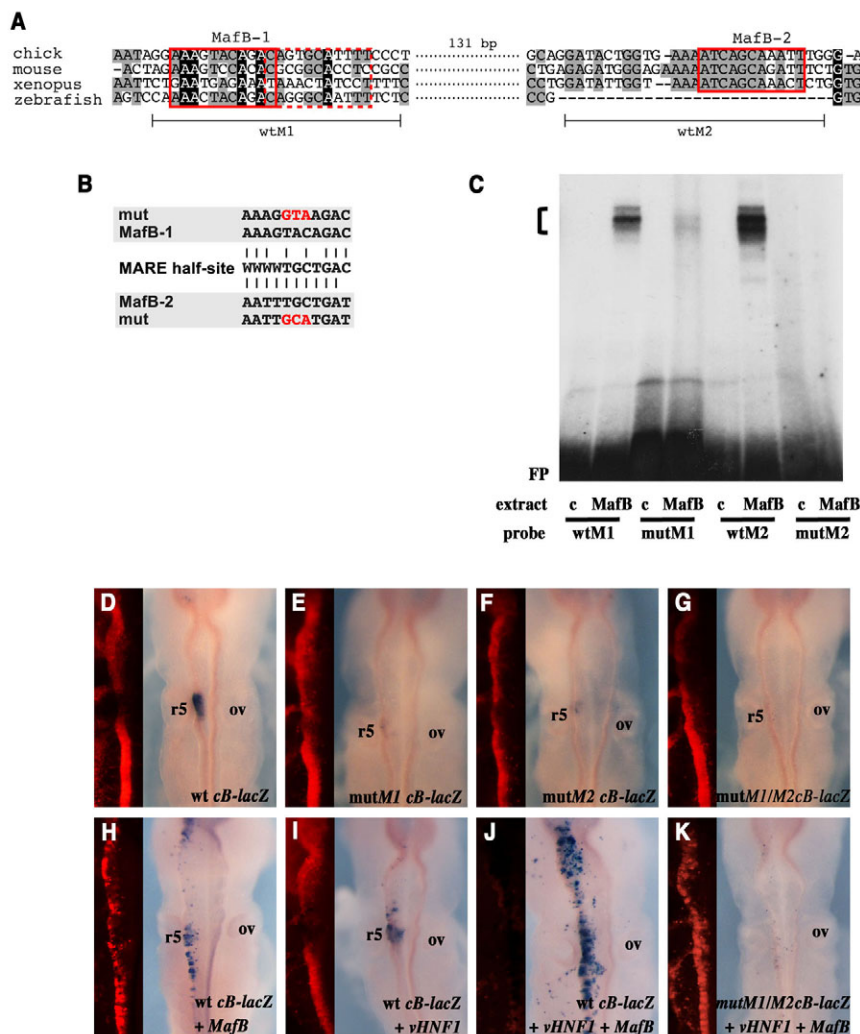


Fig. 7. Identification of functional MafB binding sites in *Krox20* enhancer B. (A) Alignment of zebrafish, *Xenopus*, chick and mouse *Krox20* element B nucleotide sequences showing the two conserved putative MafB sites MafB-1 and MafB-2 (red boxes). A sequence of lower similarity to the MafB consensus binding site, adjacent to MafB-1 and in the reverse orientation, is also indicated (dashed red box). A vHnf1 binding site is indicated by the green box. The oligonucleotides used for gel retardation (wtM1 and wtM2) are indicated beneath. (B) Alignment of MafB-1 and MafB-2 with the consensus MafB recognition element (MARE) half-site (W=A or T). The mutations introduced into the MafB-1 and MafB-2 sites are indicated in red. (C) Gel retardation analyses were performed with the indicated bacterial protein extracts (c, control without MafB protein) and oligonucleotides carrying the chick versions of the MafB-1 and MafB-2 sites, either wild-type (wtM1, wtM2) or mutated (mutM1, mutM2). FP, free probe. The bracket indicates MafB-probe shift complexes, which are abolished or largely abolished by mutation of the MafB-2 and MafB-1 sites, respectively. (D-K) Chick embryos were analysed by X-gal staining after electroporation with constructs containing wild-type (D,H-J) or mutant (E-G,K) versions of chick element B driving a β -globin promoter-*lacZ* reporter. Embryos were co-electroporated with *MafB* alone (H), *vHNF1* alone (I), or both (J,K). In all cases, a *Cherry*-expressing vector was co-electroporated to monitor electroporation efficiency; *Cherry* visualisation (red) was carried out following X-gal staining and is shown to the left of each image. Note that strong X-gal staining quenches *Cherry* fluorescence. ov, otic vesicle.

B in r5 (Chomette et al., 2006; Wassef et al., 2008). Later on, *krox20* expression is amplified and maintained under the control of the autoregulatory enhancer A (Chomette et al., 2006). In this study, using different methods to perturb FGF signalling, we have established that early levels of FGF signalling modulate the onset of *krox20* expression in r3 and r5, i.e. its timing and the expansion of its early domains, whereas *krox20* expression is only marginally dependent on FGF signalling after the 1-somite stage (Fig. 6). Consistently, FGF signalling controls both of the *krox20* initiator enhancers, whereas it has no effect on the autoregulatory element (Figs 5 and 6) and does not require the autoregulatory loop (Fig. 4F-I). Therefore, although we cannot exclude the possibility that FGF signalling also affects *krox20*

expression at another level (e.g. translational), all available data converge toward the idea that its major site of action is the onset of transcription.

In the case of r5, we went on to investigate the detailed molecular mechanisms of the pathway. We have shown that the early expression of *krox20* is mediated by direct binding of MafB to enhancer B (Fig. 7). This activation involves vHnf1, which also binds to enhancer B and cooperates synergistically with MafB (Fig. 7). Since the onset of *mafba* expression is itself controlled by FGF signalling (see Fig. S7 in the supplementary material), our data provide a detailed chain of events for the regulation of enhancer B by FGF signalling and ultimately for the control of early *krox20* expression in r5.

Early *krox20* expression sets the blueprint for r3-r5 patterning

The modifications in the onset of *krox20* expression following modulation of FGF signalling correlated with drastic variations in the sizes of mature r3, r4 and r5 at mid-somitogenesis. To explain these correlations, we propose that the number of Krox20-positive cells at early stages actually determines the later size of these territories. This idea is consistent with our current representation of the development of the r3-r5 region. It has been established that the specification of r3 and r5 absolutely requires Krox20 (Schneider-Maunoury et al., 1993; Seitanidou et al., 1997; Swiatek and Gridley, 1993; Voiculescu et al., 2001). As discussed above, *krox20* expression in r3 and r5 is initiated under the control of elements B and C. We propose that once Krox20 levels have reached a certain threshold in a cell, the autoregulatory loop based on element A is switched on. Therefore, the duration of activity of elements B and C required for permanent *krox20* expression in a cell may be very short. In addition, whereas the autoregulatory loop specifies the level of *krox20* expression during the stationary phase, it cannot modulate the number of stably expressing cells, which is determined by the level of *krox20* expression reached under the control of elements B or C and the affinity of the Krox20 binding sites present in element A. Cell proliferation will then contribute to the absolute size of the rhombomeres. However, since the rate of cell proliferation appears to be similar in the different rhombomeres (see Fig. S4 in the supplementary material), it does not affect their relative size.

In conclusion, these results fully support the idea that the mature sizes of r3 and r5 are primarily determined by the number of cells in which *krox20* is initially activated. This link explains why perturbations in FGF signalling, a pathway that precisely modulates the efficiency of initial *krox20* activation, have such dramatic effects on the relative size of the mature rhombomeres. Finally, the development of r4 inversely mirrors the number of cells stably expressing *krox20*, as *krox20* gain-of-function in a cell results in loss of r4 identity, and *krox20* loss-of-function causes a gain of r4 identity (Giudicelli et al., 2001; Voiculescu et al., 2001).

Fine-tuning of early *krox20* expression requires negative-feedback regulation of FGF signalling

As discussed above, we propose that segment formation in the r3-r5 region is based on a bistable cell-fate choice that is dependent on the activation (or not) of the Krox20 positive autoregulatory loop. Such switch-like mechanisms play central roles in the patterning of multicellular organisms (Graham et al., 2010; Kitano, 2004). Here, the binary choice is coupled with the translation of the local FGF concentration into the initial activation of *krox20*. However, because of fluctuations in the environment and in ligand concentration, transcriptional noise and the occurrence of mutations, this type of network organisation is expected to lack precision and robustness (Jaeger et al., 2008). More specifically, if the number of cells that initially activate *krox20* in r3 and r5 is of such importance for hindbrain patterning, a very precise regulation of this aspect of *krox20* expression is likely to be required. A way to buffer fluctuations and to improve precision is to introduce a cell-autonomous negative-feedback loop in the target cells (Freeman, 2000). We think that this is precisely the role of *Spry4* in this system. *spry4* is positively regulated by FGF and acts intracellularly to negatively regulate FGF signalling through inhibition of the Ras/MAPK pathway (see Figs S5 and S6 in the supplementary material) (Furthauer et al., 2001; Ozaki et al., 2005; Sasaki et al., 2001). We have shown by loss- and gain-of-function

experiments that *Spry4* negatively modulates early *krox20* expression (Fig. 3). If a feedback loop is already established when target gene activation occurs, the outcome can be a reduction in fluctuations in expression of the target gene (Brandman and Meyer, 2008). Our system works under these conditions, as the expression of *spry4* precedes that of *krox20* (Fig. 1; data not shown). In addition, release of the antagonistic action of *Spry4* is expected to lead to increased expression of the target genes, resulting in premature activation. This is precisely what is observed for *krox20* activation (Fig. 3). In conclusion, the bistable cell-fate choice required for efficient and non-ambiguous hindbrain patterning is likely to impose fine-tuning of FGF control, which is achieved through the establishment of the *Spry4* negative-feedback loop.

Acknowledgements

This work was supported by grants to P.C. from INSERM, MESR and ANR. C.L. was supported by FRM and Neuropole Ile-de-France, Y.X.B. by MESR, M.A.W. by MESR and ARC, P.A.G. by the ENS and Fondation Pierre-Gilles de Gennes and J.L.M. by MESR.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.057299/-DC1>

References

- Aragon, F. and Pujades, C. (2009). FGF signaling controls caudal hindbrain specification through Ras-ERK1/2 pathway. *BMC Dev. Biol.* **9**, 61.
- Brandman, O. and Meyer, T. (2008). Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* **322**, 390-395.
- Chomette, D., Frain, M., Cereghini, S., Charnay, P. and Ghislain, J. (2006). Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development* **133**, 1253-1262.
- Cordes, S. P. and Barsh, G. S. (1994). The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* **79**, 1025-1034.
- Desmazières, A., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. (2009). Krox20 controls the transcription of its various targets in the developing hindbrain according to multiple modes. *J. Biol. Chem.* **284**, 10831-10840.
- Freeman, M. (2000). Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature* **408**, 313-319.
- Furthauer, M., Thisse, C. and Thisse, B. (1997). A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula. *Development* **124**, 4253-4264.
- Furthauer, M., Reifers, F., Brand, M., Thisse, B. and Thisse, C. (2001). *sprouty4* acts in vivo as a feedback-induced antagonist of FGF signaling in zebrafish. *Development* **128**, 2175-2186.
- Furthauer, M., Lin, W., Ang, S. L., Thisse, B. and Thisse, C. (2002). *Sef* is a feedback-induced antagonist of Ras/MAPK-mediated FGF signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 170-174.
- Furthauer, M., Van Celst, J., Thisse, C. and Thisse, B. (2004). Fgf signalling controls the dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **131**, 2853-2864.
- Ghislain, J., Desmarquet-Trin-Dinh, C., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. and Frain, M. (2003). Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development* **130**, 941-953.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. (2001). Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev.* **15**, 567-580.
- Graham, T. G., Tabei, S. M., Dinner, A. R. and Rebay, I. (2010). Modeling bistable cell-fate choices in the *Drosophila* eye: qualitative and quantitative perspectives. *Development* **137**, 2265-2278.
- Gross, I., Bassit, B., Benezra, M. and Licht, J. D. (2001). Mammalian *sprouty* proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing *ras* activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 46460-46468.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y. and Krasnow, M. A. (1998). *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* **92**, 253-263.
- Hauptmann, G. and Gerster, T. (1994). Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos. *Trends Genet.* **10**, 266.
- Jaeger, J., Irons, D. and Monk, N. (2008). Regulative feedback in pattern formation: towards a general relativistic theory of positional information. *Development* **135**, 3175-3183.

- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 826-837.
- Komisarczuk, A. Z., Topp, S., Stigloher, C., Kapsimali, M., Bally-Cuif, L. and Becker, T. S. (2008). Enhancer detection and developmental expression of zebrafish sprouty1, a member of the fgf8 synexpression group. *Dev. Dyn.* **237**, 2594-2603.
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M. and Poss, K. D. (2005). Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* **132**, 5173-5183.
- Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trends Neurosci.* **13**, 329-335.
- Lumsden, A. and Keynes, R. (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* **337**, 424-428.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R. (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**, 1109-1115.
- Manzanares, M., Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, P., Marshall, H., Giudicelli, F., Martinez-Pastor, M. T., Krumlauf, R. and Charnay, P. (2002). Krox20 and kreisler co-operate in the transcriptional control of segmental expression of Hoxb3 in the developing hindbrain. *EMBO J.* **21**, 365-376.
- Marin, F. and Charnay, P. (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Development* **127**, 4925-4935.
- Maves, L., Jackman, W. and Kimmel, C. B. (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* **129**, 3825-3837.
- Minowada, G., Jarvis, L. A., Chi, C. L., Neubuser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M. A. and Martin, G. R. (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* **126**, 4465-4475.
- 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**, 3981-3990.
- 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**, 381-391.
- Monk, K. R., Naylor, S. G., Glenn, T. D., Mercurio, S., Perlin, J. R., Dominguez, C., Moens, C. B. and Talbot, W. S. (2009). A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* **325**, 1402-1405.
- Muller, M. V., Weizsacker, E. and Campos-Ortega, J. A. (1996). Expression domains of a zebrafish homologue of the Drosophila pair-rule gene hairy correspond to primordia of alternating somites. *Development* **122**, 2071-2078.
- Oxtoby, E. and Jowett, T. (1993). Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1087-1095.
- Ozaki, K., Miyazaki, S., Tanimura, S. and Kohno, M. (2005). Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms. *J. Cell Sci.* **118**, 5861-5871.
- Pezeron, G., Lambert, G., Dickmeis, T., Strahle, U., Rosa, F. M. and Murrain, P. (2008). Rasl11b knock down in zebrafish suppresses one-eyed-pinhead mutant phenotype. *PLoS ONE* **3**, e1434.
- Prince, V. E., Moens, C. B., Kimmel, C. B. and Ho, R. K. (1998). Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, valentino. *Development* **125**, 393-406.
- Robu, M. E., Larson, J. D., Nasevicius, A., Beiraghi, S., Brenner, C., Farber, S. A. and Ekker, S. C. (2007). p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* **3**, e78.
- Roy, N. M. and Sagerstrom, C. G. (2004). An early Fgf signal required for gene expression in the zebrafish hindbrain primordium. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **148**, 27-42.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Wakioka, T., Kato, R. and Yoshimura, A. (2001). Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 36804-36808.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C. and Charnay, P. (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* **75**, 1199-1214.
- Schneider-Maunoury, S., Seitandou, T., Charnay, P. and Lumsden, A. (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development* **124**, 1215-1226.
- Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K. W., De Robertis, E. M. and Nusslein-Volhard, C. (1994). Expression of zebrafish gooseoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development* **120**, 843-852.
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D. G. and Charnay, P. (1997). Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mech. Dev.* **65**, 31-42.
- Stedman, A., Lecaudey, V., Havis, E., Anselme, I., Wassef, M., Gilardi-Hebenstreit, P. and Schneider-Maunoury, S. (2009). A functional interaction between Irx and Meis patterns the anterior hindbrain and activates krox20 expression in rhombomere 3. *Dev. Biol.* **327**, 566-577.
- 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**, 2071-2084.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P. and Schneider-Maunoury, S. (2001). Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development* **128**, 4967-4978.
- 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**, 1117-1123.
- Wassef, M. A., Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Schneider-Maunoury, S., Gilardi-Hebenstreit, P., Charnay, P. and Ghislain, J. (2008). Rostral hindbrain patterning involves the direct activation of a Krox20 transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis factors. *Development* **135**, 3369-3378.
- Wiellette, E. L. and Sive, H. (2003). vhnf1 and Fgf signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development* **130**, 3821-3829.
- Wiellette, E. L. and Sive, H. (2004). Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in zebrafish. *Dev. Dyn.* **229**, 393-399.
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R. and Charnay, P. (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* **337**, 461-464.
- Yee, S. P. and Rigby, P. W. (1993). The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev.* **7**, 1277-1289.
- Yusoff, P., Lao, D. H., Ong, S. H., Wong, E. S., Lim, J., Lo, T. L., Leong, H. F., Fong, C. W. and Guy, G. R. (2002). Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf. *J. Biol. Chem.* **277**, 3195-3201.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aamar, E. and Frank, Dale** (2004). Xenopus Meis3 protein forms a hindbrain-inducing center by activating FGF/MAP kinase and PCP pathways. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 153–63.
- Abdelilah, S., Mountcastle-Shah, E., Harvey, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Stemple, D. L., Malicki, J., Neuhauss, S. C., Zwartkruis, F., Stainier, D. Y., et al.** (1996). Mutations affecting neural survival in the zebrafish *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, **123**, 217–27.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brûlet, P.** (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, **121**, 3279–90.
- Adams-Cioaba, M. A. and Min, J.** (2009). Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, **87**, 93–105.
- Agarwal, A., Koppstein, D., Rozowsky, J., Sboner, A., Habegger, L., Hillier, L. W., Sasidharan, R., Reinke, V., Waterston, R. H., and Gerstein, M.** (2010). Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *BMC genomics*, **11**, 383.
- Alavizadeh, A., Kiernan, A. E., Nolan, P., Lo, C., Steel, K. P., and Bucan, M** (2001). The Wheels mutation in the mouse causes vascular, hindbrain, and inner ear defects. *Developmental biology*, **234**, 244–60.
- Alexander, T., Nolte, C., and Krumlauf, Robb** (2009). Hox genes and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Annual review of cell and developmental biology*, **25**, 431–56.
- Amano, T., Sagai, T., Tanabe, H., Mizushina, Yoichi, Nakazawa, H., and Shiroishi, T.** (2009). Chromosomal dynamics at the *Shh* locus: limb bud-specific differential regulation of competence and active transcription. *Developmental cell*, **16**, 47–57.
- Amores, A.** (1998). Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution. *Science*, **282**, 1711–1714.
- Amoyel, M., Cheng, Y.-C., Jiang, Y.-J., and Wilkinson, David G** (2005). Wnt1 regulates neurogenesis and mediates lateral inhibition of boundary cell specification in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 775–85.
- Anselme, I., Laclef, C., Lanaud, M., Rüther, Ulrich, and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2007). Defects in brain patterning and head morphogenesis in the mouse mutant Fused toes. *Developmental biology*, **304**, 208–20.
- Aragon, F. and Pujades, Cristina** (2009). FGF signaling controls caudal hindbrain specification through Ras-ERK1/2 pathway. *BMC developmental biology*, **9**, 61.
- Aragón, F., Vázquez-Echeverría, C., Ulloa, E., Reber, Michael, Cereghini, Silvia, Alsina, B., Giraldez, F., and Pujades, Cristina** (2005). *vHnf1* regulates specification of caudal rhombomere identity in the chick hindbrain. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **234**, 567–76.

- Aran, D., Toperoff, G., Rosenberg, M., and Hellman, A.** (2011). Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Human molecular genetics*, **20**, 670–80.
- Arima, K., Shiotsugu, J., Niu, R., Khandpur, R., Martinez, M., Shin, Y., Koide, T., Cho, K. W. Y., Kitayama, A., Ueno, Naoto, et al.** (2005). Global analysis of RAR-responsive genes in the *Xenopus* neurula using cDNA microarrays. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **232**, 414–31.
- Arrowsmith, C. H., Bountra, C., Fish, P. V., Lee, K., and Schapira, M.** (2012). Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, **11**, 384–400.
- Aruga, J. and Mikoshiba, K.** (2011). Role of BMP, FGF, calcium signaling, and Zic proteins in vertebrate neuroectodermal differentiation. *Neurochemical research*, **36**, 1286–92.
- Assimacopoulos, S., Kao, T., Issa, N. P., and Grove, Elizabeth A** (2012). Fibroblast growth factor 8 organizes the neocortical area map and regulates sensory map topography. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 7191–201.
- Athanikar, J. N., Sanchez, H. B., and Osborne, T. F.** (1997). Promoter selective transcriptional synergy mediated by sterol regulatory element binding protein and Sp1: a critical role for the Btd domain of Sp1. *Molecular and cellular biology*, **17**, 5193–200.
- Avery, O. T., Macleod, C. M., and McCarty, M.** (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *The Journal of experimental medicine*, **79**, 137–58.
- Balciunas, D., Davidson, A. E., Sivasubbu, S., Hermanson, S. B., Welle, Z., and Ekker, S. C.** (2004). Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *BMC genomics*, **5**, 62.
- Ball, M. P., Li, J. B., Gao, Y., Lee, J.-H., LeProust, E. M., Park, I.-H., Xie, B., Daley, G. Q., and Church, G. M.** (2009). Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nature biotechnology*, **27**, 361–8.
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, **21**, 381–95.
- Bantignies, F. and Cavalli, G.** (2011). Polycomb group proteins: repression in 3D. *Trends in genetics : TIG*, **27**, 454–64.
- Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., Tixier, V., Mas, A., and Cavalli, G.** (2011). Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell*, **144**, 214–26.
- Barbacci, E., Reber, M, Ott, M. O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S** (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 4795–805.
- Barkess, G. and West, A. G.** (2012). Chromatin insulator elements: establishing barriers to set heterochromatin boundaries. *Epigenomics*, **4**, 67–80.

- Barolo, S.** (2012). Shadow enhancers: frequently asked questions about distributed cis-regulatory information and enhancer redundancy. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **34**, 135–41.
- 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 (Cambridge, England)*, **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 (Cambridge, England)*, **127**, 933–44.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Zhibin, Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K.** (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823–37.
- Bayer, T. A. and Campos-Ortega, J. A.** (1992). A transgene containing lacZ is expressed in primary sensory neurons in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **115**, 421–6.
- Becker, N., Gilardi-Hebenstreit, P, Seitanidou, T., Wilkinson, D, and Charnay, P** (1995). Characterisation of the Sek-1 receptor tyrosine kinase. *FEBS letters*, **368**, 353–7.
- Becker, N., Seitanidou, T., Murphy, P., Mattéi, M. G., Topilko, P, Nieto, M. A., Wilkinson, D G, Charnay, P, and Gilardi-Hebenstreit, P** (1994). Several receptor tyrosine kinase genes of the Eph family are segmentally expressed in the developing hindbrain. *Mechanisms of development*, **47**, 3–17.
- Becker, P. B.** (2006). Gene regulation: a finger on the mark. *Nature*, **442**, 31–2.
- Beddington, R. S.** (1994). Induction of a second neural axis by the mouse node. *Development (Cambridge, England)*, **120**, 613–20.
- Beisel, C. and Paro, R.** (2011). Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature reviews. Genetics*, **12**, 123–35.
- Bel-Vialar, Sophie, Itasaki, Nobue, and Krumlauf, Robb** (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 (Cambridge, England)*, **129**, 5103–15.
- Bell, E, Wingate, R. J., and Lumsden, A** (1999). Homeotic transformation of rhombomere identity after localized Hoxb1 misexpression. *Science (New York, N.Y.)*, **284**, 2168–71.
- Bergemann, A. D., Cheng, H. J., Brambilla, R., Klein, R., and Flanagan, J. G.** (1995). ELF-2, a new member of the Eph ligand family, is segmentally expressed in mouse embryos in the region of the hindbrain and newly forming somites. *Molecular and cellular biology*, **15**, 4921–9.
- Bernstein, B. E., Meissner, Alexander, and Lander, E. S.** (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, **128**, 669–81.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, Alex, Wernig, M., Plath, K., et al.** (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 315–26.

- Beyer, M., Mallmann, M. R., Xue, J., Staratschek-Jox, A., Vorholt, D., Krebs, W., Sommer, D., Sander, J., Mertens, C., Nino-Castro, A., et al.** (2012). High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PloS one*, **7**, e45466.
- Bird, A.** (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, **16**, 6–21.
- Birgbauer, E. and Fraser, S. E.** (1994). Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **120**, 1347–56.
- Birgbauer, E., Sechrist, J., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.** (1995). Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development (Cambridge, England)*, **121**, 935–45.
- Boettiger, A. N. and Levine, M.** (2009). Synchronous and stochastic patterns of gene activation in the Drosophila embryo. *Science (New York, N.Y.)*, **325**, 471–3.
- Boiani, M. and Schöler, Hans R** (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**, 872–84.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M. R., et al.** (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology*, **3**, e157.
- Bouchard, M., Grote, D., Craven, S. E., Sun, Q., Steinlein, P., and Busslinger, M.** (2005). Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 2633–43.
- Bradford, J. R., Hey, Y., Yates, T., Li, Yaoyong, Pepper, S. D., and Miller, C. J.** (2010). A comparison of massively parallel nucleotide sequencing with oligonucleotide microarrays for global transcription profiling. *BMC genomics*, **11**, 282.
- Bradley, L. C., Snape, A., Bhatt, S., and Wilkinson, D G** (1993). The structure and expression of the Xenopus Krox-20 gene: conserved and divergent patterns of expression in rhombomeres and neural crest. *Mechanisms of development*, **40**, 73–84.
- Branco, M. R., Branco, T., Ramirez, F., and Pombo, A.** (2008). Changes in chromosome organization during PHA-activation of resting human lymphocytes measured by cryo-FISH. *Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, **16**, 413–26.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., and Scandura, J. M.** (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PloS one*, **6**, e14524.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al.** (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO journal*, **24**, 336–46.
- Brent, A. E. and Tabin, C. J.** (2004). FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 3885–96.
- Brown, J. M., Green, J., das Neves, R. P., Wallace, H. A. C., Smith, A. J. H., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W. G., Higgs, D. R., et al.** (2008). Association between

- active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *The Journal of cell biology*, **182**, 1083–97.
- Brunskill, E. W. and Potter, S. S.** (2012). RNA-Seq defines novel genes, RNA processing patterns and enhancer maps for the early stages of nephrogenesis: Hox supergenes. *Developmental biology*, **368**, 4–17.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, Wenbiao, Hopkins, Nancy, and Brand, Michael** (2002). The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 905–16.
- Burke, L. J. and Baniahmad, A.** (2000). Co-repressors 2000. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **14**, 1876–88.
- Bénazéraf, B., Francois, P., Baker, R. E., Denans, N., Little, C. D., and Pourquié, Olivier** (2010). A random cell motility gradient downstream of FGF controls elongation of an amniote embryo. *Nature*, **466**, 248–52.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, Jose M, and Pascual-Montano, A.** (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome biology*, **8**, R3.
- 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 (Cambridge, England)*, **118**, 1063–75.
- Carroll, S B, Weatherbee, S. D., and Langeland, J. A.** (1995). Homeotic genes and the regulation and evolution of insect wing number. *Nature*, **375**, 58–61.
- Carroll, Sean B** (2005). Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS biology*, **3**, e245.
- Casamassimi, A. and Napoli, C.** (2007). Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie*, **89**, 1439–46.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Yong, Schmidt, C., Baller, J. A., Somia, N. V., Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F.** (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, **39**, e82.
- Chambers, D, Medhurst, A. D., Walsh, F. S., Price, J., and Mason, I** (2000). Differential display of genes expressed at the midbrain - hindbrain junction identifies *sprouty2*: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists. *Molecular and cellular neurosciences*, **15**, 22–35.
- Chambers, David and Mason, Ivor** (2006). A high throughput messenger RNA differential display screen identifies discrete domains of gene expression and novel patterning processes along the developing neural tube. *BMC developmental biology*, **6**, 9.
- Chambers, David, Wilson, L. J., Alfonsi, F., Hunter, E., Saxena, U., Blanc, E., and Lumsden, Andrew** (2009). Rhombomere-specific analysis reveals the repertoire of genetic cues expressed across the developing hindbrain. *Neural development*, **4**, 6.
- Chambeyron, S. and Bickmore, W. A.** (2004). Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes & development*, **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 (Cambridge, England)*, **132**, 2215–23.
- Champagne, K. S. and Kutateladze, T. G.** (2009). Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers. *Current drug targets*, **10**, 432–41.
- 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 (Cambridge, England)*, **125**, 4349–58.
- Chavrier, P., Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R., and Charnay, P** (1988). Characterization of a mouse multigene family that encodes zinc finger structures. *Molecular and cellular biology*, **8**, 1319–26.
- Chavrier, P., Vesque, C., Galliot, B., Vigneron, M., Dollé, P., Duboule, D., and Charnay, P** (1990). The segment-specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene. *The EMBO journal*, **9**, 1209–18.
- Chavrier, P., Zerial, M., Lemaire, P., Almendral, J., Bravo, R., and Charnay, P** (1988). A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *The EMBO journal*, **7**, 29–35.
- Chen, C.-Y., Morris, Q., and Mitchell, J. A.** (2012). Enhancer identification in mouse embryonic stem cells using integrative modeling of chromatin and genomic features. *BMC genomics*, **13**, 152.
- Chen, Xi, Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., et al.** (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, **133**, 1106–17.
- Chen, Y, Pollet, N., Niehrs, C., and Pieler, T** (2001). Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of Xenopus embryos. *Mechanisms of development*, **101**, 91–103.
- Cheng, C. W., Hui, C., Strähle, U., and Cheng, S. H.** (2001). Identification and expression of zebrafish Iroquois homeobox gene *irx1*. *Development genes and evolution*, **211**, 442–4.
- Cheng, H. J. and Flanagan, J. G.** (1994). Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, **79**, 157–68.
- Chinnadurai, G.** (2003). CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **25**, 9–12.
- 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.
- Cho, E. A. and Dressler, G. R.** (1998). TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mechanisms of development*, **77**, 9–18.

- Chocarro-Calvo, A., Zaballos, M. A., Santisteban, P., and García-Jiménez, C.** (2012). DARPP-32 is required for MAPK/ERK signaling in thyroid cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **26**, 471–80.
- Choe, S.-K. and Sagerström, Charles G** (2004). Paralog group 1 hox genes regulate rhombomere 5/6 expression of *vhnf1*, a repressor of rostral hindbrain fates, in a meis-dependent manner. *Developmental biology*, **271**, 350–61.
- Choe, S.-K., Vlachakis, Nikolaos, and Sagerström, Charles G** (2002). Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 585–95.
- Choe, S.-K., Zhang, Xiaolan, Hirsch, N., Straubhaar, J., and Sagerström, Charles G** (2011). A screen for *hoxb1*-regulated genes identifies *ppp1r14a1* as a regulator of the rhombomere 4 Fgf-signaling center. *Developmental biology*, **358**, 356–67.
- Chomette, D., Frain, Monique, Cereghini, Silvia, Charnay, Patrick, and Ghislain, Julien** (2006). Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 1253–62.
- Chow, J. and Heard, E.** (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Current opinion in cell biology*, **21**, 359–66.
- Christiansen, J. H., Coles, E. G., Robinson, V., Pasini, A., and Wilkinson, D G** (2001). Screening from a subtracted embryonic chick hindbrain cDNA library: identification of genes expressed during hindbrain, midbrain and cranial neural crest development. *Mechanisms of development*, **102**, 119–33.
- Clarke, J. D., Erskine, L., and Lumsden, A** (1998). Differential progenitor dispersal and the spatial origin of early neurons can explain the predominance of single-phenotype clones in the chick hindbrain. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **212**, 14–26.
- Clarke, J. D. and Lumsden, A** (1993). Segmental repetition of neuronal phenotype sets in the chick embryo hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **118**, 151–62.
- Coffinier, C., Thépot, D., Babinet, C., Yaniv, M, and Barra, J** (1999). Essential role for the homeoprotein *vHNF1/HNF1beta* in visceral endoderm differentiation. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 4785–94.
- Cooke, J. E., Kemp, H. A., and Moens, Cecilia B** (2005). EphA4 is required for cell adhesion and rhombomere-boundary formation in the zebrafish. *Current biology : CB*, **15**, 536–42.
- Cooke, J. E. and Moens, Cecilia B** (2002). Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple... *Trends in neurosciences*, **25**, 260–7.
- Cooke, J., Moens, C., Roth, L., Durbin, L., Shiomi, K., Brennan, C., Kimmel, C., Wilson, S., and Holder, N.** (2001). Eph signalling functions downstream of Val to regulate cell sorting and boundary formation in the caudal hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 571–80.
- Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Anton, E. D., Nguyen, L., and Myers, R. M.** (2006). Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome. *Genome research*, **16**, 1–10.

- Cordes, S P and Barsh, G. S.** (1994). The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell*, **79**, 1025–34.
- Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C.** (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nature structural & molecular biology*, **11**, 1037–43.
- Courey, A J and Tjian, R** (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*, **55**, 887–98.
- Cox, W. G. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development (Cambridge, England)*, **121**, 4349–58.
- Cremer, T. and Cremer, M.** (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a003889.
- Creyghton, M. P., Cheng, A. W., Welstead, G. G., Kooistra, T., Carey, B. W., Steine, E. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Frampton, G. M., Sharp, P. A., et al.** (2010). Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 21931–6.
- Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D. E., Roh, T.-Y., Cui, K., and Zhao, K.** (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome research*, **19**, 24–32.
- Cui, K., Zang, C., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W., and Zhao, K.** (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell stem cell*, **4**, 80–93.
- 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.
- Deaton, A. M. and Bird, A.** (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, **25**, 1010–22.
- Deflorian, G., Tiso, N., Ferretti, Elisabetta, Meyer, D., Blasi, Francesco, Bortolussi, M., and Argenton, F.** (2004). *Prep1.1* has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 613–27.
- Delaune, E., Lemaire, Patrick, and Kodjabachian, L.** (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 299–310.
- Dell’Era, P., Ronca, R., Coco, L., Nicoli, S., Metra, M., and Presta, M.** (2003). Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circulation research*, **93**, 414–20.
- Denis, H., Ndlovu, M. N., and Fuks, F.** (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*, **12**, 647–56.
- Desmazières, A., Charnay, Patrick, and Gilardi-Hebenstreit, Pascale** (2009). *Krox20* controls the transcription of its various targets in the developing hindbrain according to multiple modes. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 10831–40.

- Dibner, C, Elias, S, and Frank, D** (2001). XMeis3 protein activity is required for proper hindbrain patterning in *Xenopus laevis* embryos. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 3415–26.
- Dibner, Charna, Elias, Sarah, Ofir, R., Souopgui, J., Kolm, Peggy J, Sive, H., Pieler, Tomas, and Frank, Dale** (2004). The Meis3 protein and retinoid signaling interact to pattern the *Xenopus* hindbrain. *Developmental biology*, **271**, 75–86.
- Dilworth, F. J. and Chambon, P** (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*, **20**, 3047–54.
- Dorey, K. and Amaya, E.** (2010). FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **137**, 3731–42.
- Dostie, J., Zhan, Y., and Dekker, J.** (2007). Chromosome conformation capture carbon copy technology. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, **Chapter 21**, Unit 21.14.
- Downs, K. M.** (2008). Systematic localization of Oct-3/4 to the gastrulating mouse conceptus suggests manifold roles in mammalian development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **237**, 464–75.
- 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.
- Dubrulle, Julien and Pourquié, Olivier** (2004). Coupling segmentation to axis formation. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 5783–93.
- Duncan, I. W.** (2002). Transvection effects in *Drosophila*. *Annual review of genetics*, **36**, 521–56.
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., et al.** (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, **489**, 57–74.
- Dunipace, L., Ozdemir, A., and Stathopoulos, A.** (2011). Complex interactions between cis-regulatory modules in native conformation are critical for *Drosophila* snail expression. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 4075–84.
- 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 (Cambridge, England)*, **124**, 399–410.
- Dupé, V. and Lumsden, A** (2001). Hindbrain patterning involves graded responses to retinoic acid signalling. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 2199–208.
- Durston, A J, Timmermans, J. P., Hage, W. J., Hendriks, H. F., de Vries, N. J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P. D.** (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature*, **340**, 140–4.
- D'Alessio, J. A., Wright, K. J., and Tjian, Robert** (2009). Shifting players and paradigms in cell-specific transcription. *Molecular cell*, **36**, 924–31.
- Echevarría, D., Vieira, C., Gimeno, L., and Martínez, S.** (2003). Neuroepithelial secondary organizers and cell fate specification in the developing brain. *Brain research. Brain research reviews*, **43**, 179–91.

- Eddison, M., Toole, Leah, Bell, Esther, and Wingate, R. J. T.** (2004). Segmental identity and cerebellar granule cell induction in rhombomere 1. *BMC biology*, **2**, 14.
- Eichmann, A., Grapin-Botton, A., Kelly, L., Graf, T., Le Douarin, N. M., and Sieweke, M.** (1997). The expression pattern of the *mafB/kr* gene in birds and mice reveals that the kreisler phenotype does not represent a null mutant. *Mechanisms of development*, **65**, 111–22.
- Elkouby, Y. M., Elias, Sarah, Casey, E. S., Blythe, S. A., Tsabar, N., Klein, P. S., Root, H., Liu, K. J., and Frank, Dale** (2010). Mesodermal Wnt signaling organizes the neural plate via *Meis3*. *Development (Cambridge, England)*, **137**, 1531–41.
- Elkouby, Y. M., Polevoy, H., Gutkovich, Y. E., Michaelov, A., and Frank, Dale** (2012). A hindbrain-repressive *Wnt3a/Meis3/Tsh1* circuit promotes neuronal differentiation and coordinates tissue maturation. *Development (Cambridge, England)*, **139**, 1487–97.
- Ellingsen, S., Laplante, M. A., König, M., Kikuta, H., Furmanek, T., Hoivik, E. A., and Becker, T. S.** (2005). Large-scale enhancer detection in the zebrafish genome. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 3799–811.
- Faghihi, M. A. and Wahlestedt, C.** (2009). Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**, 637–43.
- Ferrai, C., de Castro, I. J., Lavitas, L., Chotalia, M., and Pombo, A.** (2010). Gene positioning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a000588.
- Ferraiuolo, M. A., Rousseau, M., Miyamoto, C., Shenker, S., Wang, X. Q. D., Nadler, M., Blanchette, M., and Dostie, J.** (2010). The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing. *Nucleic acids research*, **38**, 7472–84.
- 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 (Cambridge, England)*, **127**, 155–66.
- Ferretti, Elisabetta, Cambroner, F., Tümpel, S., Longobardi, E., Wiedemann, L. M., Blasi, Francesco, and Krumlauf, Robb** (2005). *Hoxb1* enhancer and control of rhombomere 4 expression: complex interplay between *PREP1-PBX1-HOXB1* binding sites. *Molecular and cellular biology*, **25**, 8541–52.
- Ferrier, D. E. and Holland, P. W.** Sipunculan *ParaHox* genes. *Evolution & development*, **3**, 263–70.
- Finlan, L. E., Sproul, D., Thomson, I., Boyle, S., Kerr, E., Perry, P., Ylstra, B., Chubb, J. R., and Bickmore, W. A.** (2008). Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS genetics*, **4**, e1000039.
- Fisher, a L., Ohsako, S., and Caudy, M.** (1996). The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Molecular and cellular biology*, **16**, 2670–7.
- Ford, E. and Thanos, D.** The transcriptional code of human IFN-beta gene expression. *Biochimica et biophysica acta*, **1799**, 328–36.
- 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 (Cambridge, England)*, **121**, 957–74.

- Fraser, S., Keynes, R., and Lumsden, A** (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*, **344**, 431–5.
- Freiman, R. N., Albright, S. R., Zheng, S., Sha, W. C., Hammer, R. E., and Tjian, R** (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 2084–7.
- French, C. R., Erickson, T., Callander, D., Berry, K. M., Koss, R., Hagey, D. W., Stout, J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J., Moens, Cecilia B, et al.** (2007). Pbx homeodomain proteins pattern both the zebrafish retina and tectum. *BMC developmental biology*, **7**, 85.
- Frohman, M. A., Boyle, M., and Martin, G. R.** (1990). Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the anterior-posterior axis is specified by mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, **110**, 589–607.
- 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 (Cambridge, England)*, **117**, 925–36.
- Fu, X., Fu, N., Guo, S., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Chen, Wei, Li, Yixue, Zeng, R., et al.** (2009). Estimating accuracy of RNA-Seq and microarrays with proteomics. *BMC genomics*, **10**, 161.
- Fu, Y., Sinha, M., Peterson, C. L., and Weng, Z.** (2008). The insulator binding protein CTCF positions 20 nucleosomes around its binding sites across the human genome. *PLoS genetics*, **4**, e1000138.
- Fukuchi-Shimogori, T. and Grove, E A** (2001). Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science (New York, N.Y.)*, **294**, 1071–4.
- Garcia-Dominguez, M., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Charnay, Patrick** (2006). PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *The EMBO journal*, **25**, 2432–42.
- Garel, Sonia, Huffman, K. J., and Rubenstein, J. L. R.** (2003). Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 1903–14.
- Gaufo, G O, Flodby, P., and Capecchi, M R** (2000). Hoxb1 controls effectors of sonic hedgehog and Mash1 signaling pathways. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 5343–54.
- Gaufo, Gary O, Thomas, Kirk R, and Capecchi, Mario R** (2003). Hox3 genes coordinate mechanisms of genetic suppression and activation in the generation of branchial and somatic motoneurons. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 5191–201.
- 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 (Cambridge, England)*, **124**, 3693–702.
- Gavalas, A and Krumlauf, R** (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Current opinion in genetics & development*, **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 (Cambridge, England)*, **125**, 1123–36.
- Gavalas, Anthony, Ruhrberg, C., Livet, J., Henderson, C. E., and Krumlauf, Robb** (2003). Neuronal defects in the hindbrain of Hoxa1, Hoxb1 and Hoxb2 mutants reflect regulatory interactions among these Hox genes. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 5663–79.
- Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M, Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C., and Niehrs, C.** (1998). Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mechanisms of development*, **77**, 95–141.
- Gebhard, C., Benner, C., Ehrich, M., Schwarzfischer, L., Schilling, E., Klug, M., Dietmaier, W., Thiede, C., Holler, E., Andreesen, R., et al.** (2010). General transcription factor binding at CpG islands in normal cells correlates with resistance to de novo DNA methylation in cancer cells. *Cancer research*, **70**, 1398–407.
- 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.
- Georges, A. B., Benayoun, B. A., Caburet, S., and Veitia, R. A.** (2010). Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **24**, 346–56.
- Gershenson, N. I. and Ioshikhes, I. P.** (2005). Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **21**, 1295–300.
- Gerstein, M. B., Lu, Z. J., Van Nostrand, E. L., Cheng, C., Arshinoff, B. I., Liu, T., Yip, K. Y., Robilotto, R., Rechtsteiner, A., Ikegami, K., et al.** (2010). Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 1775–87.
- Geyer, P. K.** (1997). The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Current opinion in genetics & development*, **7**, 242–8.
- Ghiasvand, N. M., Rudolph, D. D., Mashayekhi, M., Brzezinski, J. A., Goldman, D., and Glaser, T.** (2011). Deletion of a remote enhancer near ATOH7 disrupts retinal neurogenesis, causing NCRNA disease. *Nature neuroscience*, **14**, 578–86.
- Ghislain, J.** (2003). Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements cooperate for Krox20 transcriptional control. *Development*, **130**, 941–953.
- Ghislain, Julien, Desmarquet-Trin-Dinh, C., Jaegle, M., Meijer, D., Charnay, Patrick, and Frain, Monique** (2002). Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 155–66.
- Gilardi-Hebenstreit, P, Nieto, M. A., Frain, M, Mattéi, M. G., Chestier, A., Wilkinson, D G, and Charnay, P** (1992). An Eph-related receptor protein tyrosine kinase gene segmentally expressed in the developing mouse hindbrain. *Oncogene*, **7**, 2499–506.

- Gilbert, S. F.** (2000). Paradigm shifts in neural induction. *Revue d'histoire des sciences*, **53**, 555–79.
- Gilchrist, D. A., Dos Santos, G., Fargo, D. C., Xie, B., Gao, Y., Li, L., and Adelman, K.** (2010). Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell*, **143**, 540–51.
- Gimlich, R. L. and Cooke, J.** Cell lineage and the induction of second nervous systems in amphibian development. *Nature*, **306**, 471–3.
- Giudicelli, F, Taillebourg, E., Charnay, P, and Gilardi-Hebenstreit, P** (2001). Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes & development*, **15**, 567–80.
- Giudicelli, François, Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Mechta-Grigoriou, Fatima, Poquet, C., and Charnay, Patrick** (2003). Novel activities of Mafk underlie its dual role in hindbrain segmentation and regional specification. *Developmental biology*, **253**, 150–62.
- Glover, J. C., Renaud, Jean-Sébastien, and Rijli, Filippo M** (2006). Retinoic acid and hindbrain patterning. *Journal of neurobiology*, **66**, 705–25.
- 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 (Cambridge, England)*, **122**, 3217–28.
- Goll, M. G. and Bestor, T. H.** (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry*, **74**, 481–514.
- Goriely, A., Diez del Corral, R., and Storey, K. G.** (1999). c-Irx2 expression reveals an early subdivision of the neural plate in the chick embryo. *Mechanisms of development*, **87**, 203–6.
- 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.
- Graham, A., Francis-West, P., Brickell, P., and Lumsden, A** (1994). The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature*, **372**, 684–6.
- Grammatopoulos, G. A., Bell, E, Toole, L, Lumsden, A, and Tucker, A. S.** (2000). Homeotic transformation of branchial arch identity after Hoxa2 overexpression. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 5355–65.
- Grbavec, D. and Stifani, S.** (1996). Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif. *Biochemical and biophysical research communications*, **223**, 701–5.
- 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.
- Gromöller, A. and Lehming, N.** (2000). Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *The EMBO journal*, **19**, 6845–52.
- Gruber, T. M. and Gross, C. A.** (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual review of microbiology*, **57**, 441–66.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., et al.** (2008). Domain organization of

- human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, **453**, 948–51.
- Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, Rudolf, and Young, R. A.** (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, **130**, 77–88.
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., et al.** (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, **464**, 1071–6.
- Guthrie, S and Lumsden, A** (1991). Formation and regeneration of rhombomere boundaries in the developing chick hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **112**, 221–9.
- Guthrie, S, Prince, V, and Lumsden, A** (1993). Selective dispersal of avian rhombomere cells in orthotopic and heterotopic grafts. *Development (Cambridge, England)*, **118**, 527–38.
- Guthrie, Sarah** (2007). Patterning and axon guidance of cranial motor neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, 859–71.
- Gutkovich, Y. E., Ofir, R., Elkouby, Y. M., Dibner, Charna, Gefen, A., Elias, Sarah, and Frank, Dale** (2010). *Xenopus* Meis3 protein lies at a nexus downstream to Zic1 and Pax3 proteins, regulating multiple cell-fates during early nervous system development. *Developmental biology*, **338**, 50–62.
- Gómez-Skarmeta, J L, Glavic, A., de la Calle-Mustienes, E., Modolell, J, and Mayor, R** (1998). Xiro, a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Iroquois complex genes, controls development at the neural plate. *The EMBO journal*, **17**, 181–90.
- Gómez-Skarmeta, José Luis and Modolell, Juan** (2002). Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Current opinion in genetics & development*, **12**, 403–8.
- Hansen, C. S., Marion, C. D., Steele, K., George, S., and Smith, W C** (1997). Direct neural induction and selective inhibition of mesoderm and epidermis inducers by Xnr3. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 483–92.
- Hardison, R. C. and Taylor, J.** (2012). Genomic approaches towards finding cis-regulatory modules in animals. *Nature reviews. Genetics*, **13**, 469–83.
- Harrison, S. M., Houzelstein, D., Dunwoodie, S. L., and Beddington, R. S.** (2000). Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Developmental biology*, **227**, 358–72.
- Harrow, J., Denoeud, F., Frankish, A., Reymond, A., Chen, C.-K., Chrast, J., Lagarde, J., Gilbert, J. G. R., Storey, R., Swarbreck, D., et al.** (2006). GENCODE: producing a reference annotation for ENCODE. *Genome biology*, **7 Suppl 1**, S4.1–9.
- Hatzis, P. and Talianidis, I.** (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Molecular cell*, **10**, 1467–77.
- Hauptmann, G and Gerster, T.** (1995). Pou-2--a zebrafish gene active during cleavage stages and in the early hindbrain. *Mechanisms of development*, **51**, 127–38.
- Hauptmann, G and Gerster, T.** (1994). Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos. *Trends in genetics : TIG*, **10**, 266.

- Hauptmann, Giselbert, Belting, H.-G., Wolke, U., Lunde, K., Söll, I., Abdelilah-Seyfried, S., Prince, Victoria, and Driever, Wolfgang** (2002). Spiel Ohne Grenzen/Pou2 Is Required for Zebrafish Hindbrain Segmentation. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 1645–55.
- Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., Ye, Z., Lee, L. K., Stuart, R. K., Ching, C. W., et al.** (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, **459**, 108–12.
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., et al.** (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics*, **39**, 311–8.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Söderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., et al.** (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**, 43–8.
- Heltzel, A., Lee, I. W., Totis, P. A., and Summers, A. O.** (1990). Activator-dependent preinduction binding of sigma-70 RNA polymerase at the metal-regulated mer promoter. *Biochemistry*, **29**, 9572–84.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D. A.** (1994). Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell*, **77**, 273–81.
- Hendrix, D. A., Hong, J.-W., Zeitlinger, J., Rokhsar, D. S., and Levine, M. S.** (2008). Promoter elements associated with RNA Pol II stalling in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 7762–7.
- Henikoff, S. and Ahmad, K.** (2005). Assembly of variant histones into chromatin. *Annual review of cell and developmental biology*, **21**, 133–53.
- Hernandez, Rafael E, Putzke, A. P., Myers, J. P., Margaretha, L., and Moens, Cecilia B** (2007). Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development (Cambridge, England)*, **134**, 177–87.
- Hernandez, Rafael E, Rikhof, Holly A, Bachmann, R., and Moens, Cecilia B** (2004). *vhnf1* integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 4511–20.
- Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y., and Kageyama, R** (2001). Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *The EMBO journal*, **20**, 4454–66.
- Hodawadekar, S. C. and Marmorstein, R.** (2007). Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*, **26**, 5528–40.
- Holmes, M. C. and Tjian, R** (2000). Promoter-selective properties of the TBP-related factor TRF1. *Science (New York, N.Y.)*, **288**, 867–70.
- Hong, J.-W., Hendrix, D. A., and Levine, M. S.** (2008). Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. *Science (New York, N.Y.)*, **321**, 1314.

- Hou, C., Zhao, H., Tanimoto, K., and Dean, A.** (2008). CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20398–403.
- Houweling, A. C., Dildrop, R., Peters, T., Mummenhoff, J., Moorman, A. F., Rüther, U, and Christoffels, V. M.** (2001). Gene and cluster-specific expression of the Iroquois family members during mouse development. *Mechanisms of development*, **107**, 169–74.
- Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R, and Eden, A.** (2008). Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*, **27**, 404–8.
- Hoyle, J., Tang, Y. P., Wuellette, E. L., Wardle, F. C., and Sive, H.** (2004). nlz gene family is required for hindbrain patterning in the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **229**, 835–46.
- Hu, S., Xie, Z., Onishi, A., Yu, X., Jiang, L., Lin, J., Rho, H., Woodard, C., Wang, H., Jeong, J.-S., et al.** (2009). Profiling the human protein-DNA interactome reveals ERK2 as a transcriptional repressor of interferon signaling. *Cell*, **139**, 610–22.
- Huang, S., Li, X., Yusufzai, T. M., Qiu, Y., and Felsenfeld, G.** (2007). USF1 recruits histone modification complexes and is critical for maintenance of a chromatin barrier. *Molecular and cellular biology*, **27**, 7991–8002.
- Huang, Y., Fang, J., Bedford, M. T., Zhang, Yi, and Xu, R.-M.** (2006). Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science (New York, N.Y.)*, **312**, 748–51.
- Hume, C. R. and Dodd, J.** (1993). Cwnt-8C: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Development (Cambridge, England)*, **119**, 1147–60.
- Hunt, P., Whiting, J., Nonchev, S., Sham, M. H., Marshall, H, Graham, A., Cook, M., Allemann, R., Rigby, P. W., and Gulisano, M.** (1991). The branchial Hox code and its implications for gene regulation, patterning of the nervous system and head evolution. *Development (Cambridge, England)*, **Suppl 2**, 63–77.
- Hunter, M. P. and Prince, Victoria E** (2002). Zebrafish hox paralogue group 2 genes function redundantly as selector genes to pattern the second pharyngeal arch. *Developmental biology*, **247**, 367–89.
- Hutchins, A. P., Poulain, S., Fujii, H., and Miranda-Saavedra, D.** (2012). Discovery and characterization of new transcripts from RNA-seq data in mouse CD4(+) T cells. *Genomics*.
- Hérault, Y., Rassoulzadegan, M., Cuzin, F., and Duboule, D** (1998). Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAMERE). *Nature genetics*, **20**, 381–4.
- Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H., and Ueno, N** (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9337–42.
- Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., et al.** (2009). The human colon cancer

- methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, **41**, 178–86.
- 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 (Cambridge, England)*, **127**, 177–86.
- Ishibashi, S. and Yasuda, K.** (2001). Distinct roles of maf genes during *Xenopus* lens development. *Mechanisms of development*, **101**, 155–66.
- Itoh, M., Kudoh, T., Dedekian, M., Kim, C.-H., and Chitnis, A. B.** (2002). A role for *iro1* and *iro7* in the establishment of an anteroposterior compartment of the ectoderm adjacent to the midbrain-hindbrain boundary. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 2317–27.
- Jacobs, Y., Schnabel, C. A., and Cleary, M. L.** (1999). Trimeric association of Hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Molecular and cellular biology*, **19**, 5134–42.
- Jacquin, T. D., Borday, V., Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Ghilini, G., Kato, F., Charnay, P., and Champagnat, J.** (1996). Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron*, **17**, 747–58.
- Janssens, S., Denayer, T., Deroo, T., Van Roy, F., and Vleminckx, K.** (2010). Direct control of Hoxd1 and Irx3 expression by Wnt/beta-catenin signaling during anteroposterior patterning of the neural axis in *Xenopus*. *The International journal of developmental biology*, **54**, 1435–42.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 1074–80.
- Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R. N., Warga, R. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., et al.** (1996). Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)*, **123**, 205–16.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G.** (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nature genetics*, **41**, 941–5.
- Jones, S.** (2004). An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome biology*, **5**, 226.
- Jozefowicz, C., McClintock, J., and Prince, Victoria** (2003). The fates of zebrafish Hox gene duplicates. *Journal of structural and functional genomics*, **3**, 185–94.
- Jungbluth, S., Bell, E., and Lumsden, A.** (1999). Specification of distinct motor neuron identities by the singular activities of individual Hox genes. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 2751–8.
- Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R.** (2003). Protein family review Sp1- and Krüppel-like transcription factors. 1–8.
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., et al.** (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, **467**, 430–5.
- Kageyama, Ryoichiro, Ohtsuka, T., and Kobayashi, T.** (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Development, growth & differentiation*, **50 Suppl 1**, S97–103.

- Kastner, P., Mark, M., Ghyselinck, N., Krezel, W., Dupé, V., Grondona, J. M., and Chambon, P** (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 313–26.
- Keenan, I. D., Sharrard, R. M., and Isaacs, H. V.** (2006). FGF signal transduction and the regulation of Cdx gene expression. *Developmental biology*, **299**, 478–88.
- Kehayova, P., Monahan, K., Chen, Weisheng, and Maniatis, T.** (2011). Regulatory elements required for the activation and repression of the protocadherin-alpha gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 17195–200.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., and Haussler, D.** (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome research*, **12**, 996–1006.
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., van Oudenaarden, A., et al.** (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 11667–72.
- Kim, F. A., Sing I, A., Kaneko, T., Bieman, M., Stallwood, N., Sadl, V. S., and Cordes, Sabine P** (2005). The vHNF1 homeodomain protein establishes early rhombomere identity by direct regulation of Kreisler expression. *Mechanisms of development*, **122**, 1300–9.
- Kim, J.-H., Cho, E.-J., Kim, S.-T., and Youn, H.-D.** (2005). CtBP represses p300-mediated transcriptional activation by direct association with its bromodomain. *Nature structural & molecular biology*, **12**, 423–8.
- Kim, K. H., Moon, M., Yu, S.-B., Mook-Jung, I., and Kim, J.-I.** (2012). RNA-Seq analysis of frontal cortex and cerebellum from 5XFAD mice at early stage of disease pathology. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, **29**, 793–808.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J. M., Costa, A. M., Bear, D. M., Wu, J., Harmin, D. A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al.** (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, **465**, 182–7.
- Kim, Y. J., Cecchini, K. R., and Kim, T. H.** (2011). Conserved, developmentally regulated mechanism couples chromosomal looping and heterochromatin barrier activity at the homeobox gene A locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 7391–6.
- Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., et al.** (2006). Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome research*, **16**, 55–65.
- Klingensmith, J., Ang, S. L., Bachiller, D., and Rossant, J.** (1999). Neural induction and patterning in the mouse in the absence of the node and its derivatives. *Developmental biology*, **216**, 535–49.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X. S., and Ahringer, J.** (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature genetics*, **41**, 376–81.

- Kolm, P J and Sive, H. L.** (1995). Regulation of the *Xenopus* labial homeodomain genes, *HoxA1* and *HoxD1*: activation by retinoids and peptide growth factors. *Developmental biology*, **167**, 34–49.
- Komisarczuk, A. Z., Topp, S., Stigloher, C., Kapsimali, M., Bally-Cuif, Laure, and Becker, T. S.** (2008). Enhancer detection and developmental expression of zebrafish *sprouty1*, a member of the *fgf8* synexpression group. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **237**, 2594–603.
- Korn, R., Schoor, M., Neuhaus, H., Henseling, U., Soininen, R., Zachgo, J., and Gossler, A.** (1992). Enhancer trap integrations in mouse embryonic stem cells give rise to staining patterns in chimaeric embryos with a high frequency and detect endogenous genes. *Mechanisms of development*, **39**, 95–109.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693–705.
- Krivega, I. and Dean, A.** (2012). Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Current opinion in genetics & development*, **22**, 79–85.
- Krumlauf, R** (1993). Hox genes and pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends in genetics: TIG*, **9**, 106–12.
- Ku, G. M., Kim, H., Vaughn, I. W., Hangauer, M. J., Myung Oh, C., German, M. S., and McManus, M. T.** (2012). Research Resource: RNA-Seq Reveals Unique Features of the Pancreatic β -Cell Transcriptome. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **26**, 1783–92.
- Kudoh, T., Wilson, S. W., and Dawid, I. B.** (2002). Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 4335–46.
- Kulesa, P. M. and Fraser, S. E.** (2000). In ovo time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 1161–72.
- Kumano, G. and Smith, William C** (2002). Revisions to the *Xenopus* gastrula fate map: implications for mesoderm induction and patterning. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **225**, 409–21.
- Kurukuti, S., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenkova, V., Reik, W., and Ohlsson, R.** (2006). CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *Igf2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 10684–9.
- Kvon, E. Z., Stampfel, G., Yáñez-Cuna, J. O., Dickson, B. J., and Stark, A.** (2012). HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature. *Genes & development*, **26**, 908–13.
- Kwak, S.-J., Phillips, B. T., Heck, R., and Riley, B. B.** (2002). An expanded domain of *fgf3* expression in the hindbrain of zebrafish *valentino* mutants results in mis-patterning of the otic vesicle. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 5279–87.
- Labalette, C., Bouchouca, Y. X., Wassef, M. A., Gongal, P. A., Le Men, J., Becker, T., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Charnay, Patrick** (2011). Hindbrain patterning requires fine-tuning of early *krox20* transcription by *Sprouty 4*. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 317–26.

- Lagha, M., Bothma, J. P., and Levine, M.** (2012). Mechanisms of transcriptional precision in animal development. *Trends in genetics : TIG*, **28**, 409–16.
- Langston, A. W. and Gudas, L. J.** (1992). Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mechanisms of development*, **38**, 217–27.
- Lanzuolo, C., Roure, V., Dekker, J., Bantignies, F., and Orlando, V.** (2007). Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex. *Nature cell biology*, **9**, 1167–74.
- Launay, C., Fromentoux, V., Shi, D. L., and Boucaut, J. C.** (1996). A truncated FGF receptor blocks neural induction by endogenous *Xenopus* inducers. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 869–80.
- Laurent, A., Bihan, R., Omilli, F., Deschamps, S., and Pellerin, I.** (2008). PBX proteins: much more than Hox cofactors. *The International journal of developmental biology*, **52**, 9–20.
- Lavial, F., Aclouque, H., Bertocchini, F., Macleod, D. J., Boast, S., Bachelard, E., Montillet, G., Thenot, S., Sang, H. M., Stern, Claudio D, et al.** (2007). The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, **134**, 3549–63.
- Lecaudey, V., Thisse, C., Thisse, B., and Schneider-Maunoury, S** (2001). Sequence and expression pattern of *zro7*, a novel, divergent zebrafish *iroquois* homeobox gene. *Mechanisms of development*, **109**, 383–8.
- Lecaudey, Virginie, Anselme, I., Dildrop, Renate, Rüther, Ulrich, and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2005). Expression of the zebrafish *Iroquois* genes during early nervous system formation and patterning. *The Journal of comparative neurology*, **492**, 289–302.
- Lecaudey, Virginie, Anselme, I., Rosa, F., and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2004). The zebrafish *Iroquois* gene *iro7* positions the *r4/r5* boundary and controls neurogenesis in the rostral hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 3121–31.
- Leclerc, C., N  ant, I., and Moreau, M.** (2011). Early neural development in vertebrates is also a matter of calcium. *Biochimie*, **93**, 2102–11.
- Lee, M. G., Wynder, C., Cooch, N., and Shiekhatar, R.** (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, **437**, 432–5.
- Lefebvre, L., Mar, L., Bogutz, A., Oh-McGinnis, R., Mandegar, M. A., Paderova, J., Gertsenstein, M., Squire, J. A., and Nagy, A.** (2009). The interval between *Ins2* and *Ascl2* is dispensable for imprinting centre function in the murine Beckwith-Wiedemann region. *Human molecular genetics*, **18**, 4255–67.
- Lejard, V., Blais, F., Guerquin, M.-J., Bonnet, A., Bonnin, M.-A., Havis, E., Malbouyres, M., Bidaud, C. B., Maro, G., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, et al.** (2011). EGR1 and EGR2 involvement in vertebrate tendon differentiation. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 5855–67.
- Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P.** (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature reviews. Genetics*, **13**, 233–45.

- Levi, G., Topilko, P, Schneider-Maunoury, S, Lasagna, M., Mantero, S., Cancedda, R., and Charnay, P** (1996). Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 113–20.
- Levine, M.** (2011). Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. *Cell*, **145**, 502–11.
- Levine, M. and Tjian, Robert** (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, **424**, 147–51.
- Lewis, M.** (1996). Response: DNA Looping and Lac Repressor--CAP Interaction. *Science (New York, N.Y.)*, **274**, 1931–2.
- Li, B., Kuriyama, S., Moreno, M., and Mayor, Roberto** (2009). The posteriorizing gene Gbx2 is a direct target of Wnt signalling and the earliest factor in neural crest induction. *Development (Cambridge, England)*, **136**, 3267–78.
- Li, J. Y. and Joyner, a L.** (2001). Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 4979–91.
- Li, Yuhong, Danzer, J. R., Alvarez, Pedro, Belmont, A. S., and Wallrath, L. L.** (2003). Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the Drosophila genome. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 1817–24.
- Liang, H.-L., Nien, C.-Y., Liu, H.-Y., Metzstein, M. M., Kirov, N., and Rushlow, C.** (2008). The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in Drosophila. *Nature*, **456**, 400–3.
- Liang, P. and Pardee, A. B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science (New York, N.Y.)*, **257**, 967–71.
- Ligon, K. L., Fancy, S. P. J., Franklin, R. J. M., and Rowitch, D. H.** (2006). Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*, **54**, 1–10.
- Linker, C. and Stern, Claudio D** (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 5671–81.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., et al.** (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, **462**, 315–22.
- Liu, A, Losos, K., and Joyner, A. L.** (1999). FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse brain into a hindbrain fate. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 4827–38.
- Liu, Anguo, Hoffman, P. W., Lu, W., and Bai, G.** (2004). NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 17449–58.
- 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.
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D. J., Mendelsohn, M., Kirkland, J., and Axel, R.** (2006). Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*, **126**, 403–13.

- Lowery, L. A. and Sive, H.** (2004). Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mechanisms of development*, **121**, 1189–97.
- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., and Misteli, T.** (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, **327**, 996–1000.
- Lumsden, A and Keynes, R.** (1989). Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature*, **337**, 424–8.
- Lumsden, A and Krumlauf, R** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science (New York, N.Y.)*, **274**, 1109–15.
- Lumsden, A, Sprawson, N., and Graham, A.** (1991). Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development (Cambridge, England)*, **113**, 1281–91.
- Lumsden, Andrew** (2004). Segmentation and compartmentation in the early avian hindbrain. *Mechanisms of development*, **121**, 1081–8.
- MacArthur, S., Li, X.-Y., Li, J., Brown, J. B., Chu, H. C., Zeng, Lucy, Grondona, B. P., Hechmer, A., Simirenko, L., Keränen, S. V. E., et al.** (2009). Developmental roles of 21 Drosophila transcription factors are determined by quantitative differences in binding to an overlapping set of thousands of genomic regions. *Genome biology*, **10**, R80.
- Maconochie, M. K., Nonchev, S., Manzanares, M, Marshall, H, and Krumlauf, R** (2001). Differences in Krox20-dependent regulation of Hoxa2 and Hoxb2 during hindbrain development. *Developmental biology*, **233**, 468–81.
- 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 & development*, **11**, 1885–95.
- Maeda, R. K. and Karch, F.** (2007). Making connections: boundaries and insulators in Drosophila. *Current opinion in genetics & development*, **17**, 394–9.
- Mahoney Rogers, A. A., Zhang, J., and Shim, K.** (2011). Sprouty1 and Sprouty2 limit both the size of the otic placode and hindbrain Wnt8a by antagonizing FGF signaling. *Developmental biology*, **353**, 94–104.
- Makki, N. and Capecchi, Mario R** (2010). Hoxa1 lineage tracing indicates a direct role for Hoxa1 in the development of the inner ear, the heart, and the third rhombomere. *Developmental biology*, **341**, 499–509.
- Makki, N. and Capecchi, Mario R** (2011). Identification of novel Hoxa1 downstream targets regulating hindbrain, neural crest and inner ear development. *Developmental biology*, **357**, 295–304.
- Malone, J. H. and Oliver, B.** (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC biology*, **9**, 34.
- 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. *Developmental biology*, **192**, 274–88.

- Mann, R S and Affolter, M.** (1998). Hox proteins meet more partners. *Current opinion in genetics & development*, **8**, 423–9.
- Mann, Richard S, Lelli, K. M., and Joshi, R.** (2009). Hox specificity unique roles for cofactors and collaborators. *Current topics in developmental biology*, **88**, 63–101.
- 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 (Cambridge, England)*, **128**, 3595–607.
- Manzanares, M, Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G., and Krumlauf, R** (1999). Conserved and distinct roles of kreisler in regulation of the paralogous Hoxa3 and Hoxb3 genes. *Development (Cambridge, England)*, **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, Trainor, P A, Nonchev, S., Ariza-McNaughton, L., Brodie, J., Gould, A., Marshall, H, Morrison, A., Kwan, C. T., Sham, M. H., et al.** (1999). The role of kreisler in segmentation during hindbrain development. *Developmental biology*, **211**, 220–37.
- Manzanares, Miguel, Nardelli, J., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Marshall, Heather, Giudicelli, François, Martínez-Pastor, M. T., Krumlauf, Robb, and Charnay, Patrick** (2002). Krox20 and kreisler co-operate in the transcriptional control of segmental expression of Hoxb3 in the developing hindbrain. *The EMBO journal*, **21**, 365–76.
- Mar, L., Rivkin, E., Kim, D. Y., Yu, J. Y., and Cordes, Sabine P** (2005). A genetic screen for mutations that affect cranial nerve development in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 11787–95.
- Marchal, L., Luxardi, G., Thomé, V., and Kodjabachian, L.** (2009). BMP inhibition initiates neural induction via FGF signaling and Zic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 17437–42.
- Marguerat, S. and Bähler, J.** (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **67**, 569–79.
- Marioni, J. C., Mason, C. E., Mane, S. M., Stephens, M., and Gilad, Y.** (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome research*, **18**, 1509–17.
- 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 (Cambridge, England)*, **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, S., Crossley, P. H., Cobos, I., Rubenstein, J. L., and Martin, G. R.** (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmocerebellar

- development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development (Cambridge, England)*, **126**, 1189–200.
- Marín, F. and Charnay, P** (2000). Hindbrain patterning: FGFs regulate Krox20 and mafB/kr expression in the otic/preotic region. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 4925–35.
- Mason, Ivor** (2007). Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Nature reviews. Neuroscience*, **8**, 583–96.
- Matsumoto, K., Nishihara, S., Kamimura, M., Shiraishi, T., Otaguro, T., Uehara, M., Maeda, Y., Ogura, K., Lumsden, Andrew, and Ogura, T.** (2004). The prepattern transcription factor Irx2, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nature neuroscience*, **7**, 605–12.
- Maves, L., Jackman, W., and Kimmel, Charles B** (2002). FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 3825–37.
- Maves, L. and Kimmel, Charles B** (2005). Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Developmental biology*, **285**, 593–605.
- McClintock, J. M., Carlson, R., Mann, D. M., and Prince, Victoria E.** (2001). Consequences of Hox gene duplication in the vertebrates: an investigation of the zebrafish Hox paralogue group 1 genes. *Development*, **128**, 2471–2484.
- McClintock, J. M., Kheirbek, M. A., and Prince, Victoria E** (2002). Knockdown of duplicated zebrafish hoxb1 genes reveals distinct roles in hindbrain patterning and a novel mechanism of duplicate gene retention. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 2339–54.
- McGrew, L. L., Lai, C. J., and Moon, R T** (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Developmental biology*, **172**, 337–42.
- McKay, I. J., Lewis, J., and Lumsden, A** (1996). The role of FGF-3 in early inner ear development: an analysis in normal and kreisler mutant mice. *Developmental biology*, **174**, 370–8.
- 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 (Cambridge, England)*, **120**, 2199–211.
- McNulty, C. L., Peres, J. N., Bardine, N., van den Akker, W. M. R., and Durston, Antony J** (2005). Knockdown of the complete Hox paralogous group 1 leads to dramatic hindbrain and neural crest defects. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 2861–71.
- Mechta-Grigoriou, F, Garel, S, and Charnay, P** (2000). Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 119–28.
- Mechta-Grigoriou, Fatima, Giudicelli, Francois, Pujades, Cristina, Charnay, Patrick, and Yaniv, Moshe** (2003). c-jun regulation and function in the developing hindbrain. *Developmental biology*, **258**, 419–31.
- Meissner, Alexander, Wernig, M., and Jaenisch, Rudolf** (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, **25**, 1177–81.

- Meyers, E. N., Lewandoski, M., and Martin, G. R.** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nature genetics*, **18**, 136–41.
- Meyers, E. N. and Martin, G. R.** (1999). Differences in left-right axis pathways in mouse and chick: functions of FGF8 and SHH. *Science (New York, N.Y.)*, **285**, 403–6.
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, Pablo, Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R. P., et al.** (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, **448**, 553–60.
- Miller, W., Makova, K. D., Nekrutenko, A., and Hardison, R. C.** (2004). Comparative genomics. *Annual review of genomics and human genetics*, **5**, 15–56.
- Mills, A. A.** (2010). Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nature reviews. Cancer*, **10**, 669–82.
- 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 (Cambridge, England)*, **125**, 381–91.
- 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 (Cambridge, England)*, **122**, 3981–90.
- Moens, Cecilia B and Prince, Victoria E** (2002). Constructing the hindbrain: insights from the zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **224**, 1–17.
- Moens, Cecilia B and Selleri, L.** (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Developmental biology*, **291**, 193–206.
- Molina, C. and Grotewold, E.** (2005). Genome wide analysis of Arabidopsis core promoters. *BMC genomics*, **6**, 25.
- Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., de Laat, W., Spitz, F., and Duboule, Denis** (2011). A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell*, **147**, 1132–45.
- Moore, L. D., Le, T., and Fan, G.** (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*.
- Moorman, C., Sun, L. V., Wang, Junbai, de Wit, E., Talhout, W., Ward, L. D., Greil, F., Lu, X.-J., White, K. P., Bussemaker, H. J., et al.** (2006). Hotspots of transcription factor colocalization in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 12027–32.
- Moreau, M., Néant, I., Webb, S. E., Miller, A. L., and Leclerc, C.** (2008). Calcium signalling during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **363**, 1371–5.
- Morey, C., Da Silva, N. R., Kmita, M., Duboule, Denis, and Bickmore, W. A.** (2008). Ectopic nuclear reorganisation driven by a Hoxb1 transgene transposed into Hoxd. *Journal of cell science*, **121**, 571–7.
- 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 (Cambridge, England)*, **122**, 1895–907.

- Morrison, G. M. and Brickman, J. M.** (2006). Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 2011–22.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., Mccue, K., Schaeffer, L., and Wold, B.** (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **5**, 1–8.
- Moscou, M. J. and Bogdanove, A. J.** (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science (New York, N.Y.)*, **326**, 1501.
- Muffato, M., Louis, A., Poisnel, C.-E., and Roest Crolius, H.** (2010). Genomicus: a database and a browser to study gene synteny in modern and ancestral genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **26**, 1119–21.
- Muhr, J., Graziano, E., Wilson, S., Jessell, T M, and Edlund, T** (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*, **23**, 689–702.
- Muhr, J., Jessell, T M, and Edlund, T** (1997). Assignment of early caudal identity to neural plate cells by a signal from caudal paraxial mesoderm. *Neuron*, **19**, 487–502.
- Mujtaba, S., Zeng, L, and Zhou, M.-M.** (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene*, **26**, 5521–7.
- Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., and Jyothy, A.** (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, **36**, 75–88.
- Murphy, P. and Hill, R. E.** (1991). Expression of the mouse labial-like homeobox-containing genes, Hox 2.9 and Hox 1.6, during segmentation of the hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **111**, 61–74.
- Nagalakshmi, U., Wang, Zhong, Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science (New York, N.Y.)*, **320**, 1344–9.
- Nakamura, M., Choe, S.-K., Runko, A. P., Gardner, P. D., and Sagerström, Charles G** (2008). Nlz1/Znf703 acts as a repressor of transcription. *BMC developmental biology*, **8**, 108.
- Nakamura, M., Runko, A. P., and Sagerström, Charles G** (2004). A novel subfamily of zinc finger genes involved in embryonic development. *Journal of cellular biochemistry*, **93**, 887–95.
- Negre, B. and Ruiz, A.** (2007). HOM-C evolution in Drosophila: is there a need for Hox gene clustering? *Trends in genetics : TIG*, **23**, 55–9.
- Neuhauss, S. C., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkruis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., Abdelilah, S., Stainier, D. Y., and Driever, W** (1996). Mutations affecting craniofacial development in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **123**, 357–67.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, **95**, 379–91.

- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Dollé, P** (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 75–85.
- Nieto, M. A., Bradley, L. C., and Wilkinson, D G** (1991). Conserved segmental expression of Krox-20 in the vertebrate hindbrain and its relationship to lineage restriction. *Development (Cambridge, England)*, **Suppl 2**, 59–62.
- Nieto, M. A., Gilardi-Hebenstreit, P, Charnay, P, and Wilkinson, D G** (1992). A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development (Cambridge, England)*, **116**, 1137–50.
- Niewkoop, P. D.** (1952). Activation and organization of the central nervous system in amphibians. Part III. Synthesis of a new working hypothesis. *J. Exp. Zool.* **120**: 83-108.
- Nittenberg, R., Patel, K., Joshi, Y., Krumlauf, R, Wilkinson, D G, Brickell, P. M., Tickle, C., and Clarke, J. D.** (1997). Cell movements, neuronal organisation and gene expression in hindbrains lacking morphological boundaries. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 2297–306.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, Jose María, and Pascual-Montano, A.** (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic acids research*, **37**, W317–22.
- Nolis, I. K., McKay, D. J., Mantouvalou, E., Lomvardas, S., Merika, M., and Thanos, D.** (2009). Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 20222–7.
- Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M, Maruthainar, K., Kuroiwa, a, Brenner, S., Charnay, P, et al.** (1996). The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **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** (1996). Segmental expression of Hoxa-2 in the hindbrain is directly regulated by Krox-20. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 543–54.
- Nordström, U., Jessell, Thomas M, and Edlund, Thomas** (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nature neuroscience*, **5**, 525–32.
- Nordström, U., Maier, E., Jessell, Thomas M, and Edlund, Thomas** (2006). An early role for WNT signaling in specifying neural patterns of Cdx and Hox gene expression and motor neuron subtype identity. *PLoS biology*, **4**, e252.
- Numayama-Tsuruta, K., Arai, Y., Takahashi, M., Sasaki-Hoshino, M., Funatsu, N., Nakamura, S., and Osumi, N.** (2010). Downstream genes of Pax6 revealed by comprehensive transcriptome profiling in the developing rat hindbrain. *BMC developmental biology*, **10**, 6.
- Néron, B., Ménager, H., Maufrais, C., Joly, N., Maupetit, J., Letort, S., Carrere, S., Tuffery, P., and Letondal, C.** (2009). Mobylye: a new full web bioinformatics framework. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **25**, 3005–11.

- Ohler, U.** (2006). Identification of core promoter modules in *Drosophila* and their application in accurate transcription start site prediction. *Nucleic acids research*, **34**, 5943–50.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**, 313–7.
- Ong, C.-T. and Corces, V. G.** (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature reviews. Genetics*, **12**, 283–93.
- Ornitz, D. M.** (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine & growth factor reviews*, **16**, 205–13.
- Ornitz, D. M. and Marie, P. J.** (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & development*, **16**, 1446–65.
- Orom, U. A. and Shiekhattar, R.** (2011). Noncoding RNAs and enhancers: complications of a long-distance relationship. *Trends in genetics : TIG*, **27**, 433–9.
- Ossipova, O., Stick, R., and Pieler, Tomas** (2002). XSPR-1 and XSPR-2, novel Sp1 related zinc finger containing genes, are dynamically expressed during *Xenopus* embryogenesis. *Mechanisms of development*, **115**, 117–22.
- Ott, M. O., Rey-Campos, J., Cereghini, S, and Yaniv, M** (1991). vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mechanisms of development*, **36**, 47–58.
- Oury, F., Murakami, Y., Renaud, Jean-Sebastien, Pasqualetti, Massimo, Charnay, Patrick, Ren, S.-Y., and Rijli, Filippo M** (2006). Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science (New York, N.Y.)*, **313**, 1408–13.
- Ovitt, C. E. and Schöler, H R** (1998). The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. *Molecular human reproduction*, **4**, 1021–31.
- Oxtoby, E. and Jowett, T.** (1993). Cloning of the zebrafish krox-20 gene (krx-20) and its expression during hindbrain development. *Nucleic acids research*, **21**, 1087–95.
- O’Leary, D. D. M., Chou, S.-J., and Sahara, S.** (2007). Area patterning of the mammalian cortex. *Neuron*, **56**, 252–69.
- 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 (Cambridge, England)*, **125**, 1991–8.
- Pai, C.-Y., Lei, E. P., Ghosh, D., and Corces, V. G.** (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Molecular cell*, **16**, 737–48.
- Panne, D.** (2008). The enhanceosome. *Current opinion in structural biology*, **18**, 236–42.
- Papalopulu, N., Lovell-Badge, R., and Krumlauf, R** (1991). The expression of murine Hox-2 genes is dependent on the differentiation pathway and displays a collinear sensitivity to retinoic acid in F9 cells and *Xenopus* embryos. *Nucleic acids research*, **19**, 5497–506.
- Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V., and Emelyanov, A.** (2004). Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo.

Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, **231**, 449–59.

- Parker, D. S., White, M. A., Ramos, A. I., Cohen, B. A., and Barolo, S.** (2011). The cis-regulatory logic of Hedgehog gradient responses: key roles for gli binding affinity, competition, and cooperativity. *Science signaling*, **4**, ra38.
- Parvin, M. S., Okuyama, N., Inoue, F., Islam, M. E., Kawakami, A., Takeda, Hiroyuki, and Yamasu, K.** (2008). Autoregulatory loop and retinoic acid repression regulate pou2/pou5f1 gene expression in the zebrafish embryonic brain. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **237**, 1373–88.
- Pasini, D., Bracken, A. P., Agger, K., Christensen, J., Hansen, K., Cloos, P. A. C., and Helin, K.** (2008). Regulation of stem cell differentiation by histone methyltransferases and demethylases. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **73**, 253–63.
- Pasqualetti, M, Ori, M., Nardi, I., and Rijli, F M** (2000). Ectopic Hoxa2 induction after neural crest migration results in homeosis of jaw elements in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)*, **127**, 5367–78.
- Pasqualetti, Massimo, Díaz, C., Renaud, Jean-Sébastien, Rijli, Filippo M, and Glover, J. C.** (2007). Fate-mapping the mammalian hindbrain: segmental origins of vestibular projection neurons assessed using rhombomere-specific Hoxa2 enhancer elements in the mouse embryo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 9670–81.
- Paxton, C. N., Bleyl, S. B., Chapman, S. C., and Schoenwolf, Gary C** (2010). Identification of differentially expressed genes in early inner ear development. *Gene expression patterns: GEP*, **10**, 31–43.
- Payankulam, S., Li, L. M., and Arnosti, D. N.** (2010). Transcriptional repression: conserved and evolved features. *Current biology: CB*, **20**, R764–71.
- Perea-Gomez, A., Rhinn, M, and Ang, S. L.** (2001). Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *The International journal of developmental biology*, **45**, 311–20.
- Perry, M. W., Boettiger, A. N., Bothma, J. P., and Levine, M.** (2010). Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Current biology: CB*, **20**, 1562–7.
- Pesce, M., Gross, M. K., and Schöler, H R** (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **20**, 722–32.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M.** (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, **86**, 589–98.
- Portales-Casamar, E., Kirov, S., Lim, J., Lithwick, S., Swanson, M. I., Ticoll, A., Snoddy, J., and Wasserman, W. W.** (2007). PAZAR: a framework for collection and dissemination of cis-regulatory sequence annotation. *Genome biology*, **8**, R207.
- Pouilhe, M., Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Desmarquet-Trin Dinh, C., and Charnay, Patrick** (2007). Direct regulation of vHnf1 by retinoic acid signaling and MAF-related factors in the neural tube. *Developmental biology*, **309**, 344–57.

- Power, S. C. and Cereghini, S** (1996). Positive regulation of the vHNF1 promoter by the orphan receptors COUP-TF1/Ear3 and COUP-TFII/Arp1. *Molecular and cellular biology*, **16**, 778–91.
- Prince, V E, Moens, C B, Kimmel, C B, and Ho, R K** (1998). Zebrafish hox genes: expression in the hindbrain region of wild-type and mutants of the segmentation gene, *valentino*. *Development (Cambridge, England)*, **125**, 393–406.
- Prince, V and Lumsden, A** (1994). Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development (Cambridge, England)*, **120**, 911–23.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J.** (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501–12.
- 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.
- Pöpperl, H., Rikhof, H., Chang, H., Haffter, P., Kimmel, C B, and Moens, C B** (2000). *lazarus* is a novel *pbx* gene that globally mediates hox gene function in zebrafish. *Molecular cell*, **6**, 255–67.
- Raab, J. R. and Kamakaka, R. T.** (2010). Insulators and promoters: closer than we think. *Nature reviews. Genetics*, **11**, 439–46.
- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Prescott, S., Brugmann, S. A., Swigut, T., and Wysocka, J.** (2012). Epigenomic Annotation of Enhancers Predicts Transcriptional Regulators of Human Neural Crest. *Cell Stem Cell*.
- Rada-Iglesias, A., Bajpai, R., Swigut, T., Brugmann, S. A., Flynn, R. A., and Wysocka, J.** (2011). A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature*, **470**, 279–83.
- Ragoczy, T., Bender, M. A., Telling, A., Byron, R., and Groudine, M.** (2006). The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes & development*, **20**, 1447–57.
- Ragoczy, T., Telling, A., Sawado, T., Groudine, M., and Kosak, S. T.** (2003). A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, **11**, 513–25.
- Raible, F. and Brand, M** (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by *Fgf* signaling during early zebrafish development. *Mechanisms of development*, **107**, 105–17.
- Ramirez-Carrozzi, V. R., Braas, D., Bhatt, D. M., Cheng, C. S., Hong, C., Doty, K. R., Black, J. C., Hoffmann, A., Carey, M., and Smale, S. T.** (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell*, **138**, 114–28.
- Ramos-Mejía, V., Escalante-Alcalde, D., Kunath, T., Ramírez, L., Gertsenstein, M., Nagy, A., and Lomelí, H.** (2005). Phenotypic analyses of mouse embryos with ubiquitous expression of *Oct4*: effects on mid-hindbrain patterning and gene expression.

Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, **232**, 180–90.

- Reddy, K. L., Zullo, J. M., Bertolino, E., and Singh, H.** (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*, **452**, 243–7.
- Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y., and Brand, M** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **125**, 2381–95.
- Reifers, F., Walsh, E. C., Léger, S., Stainier, D. Y., and Brand, M** (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development (Cambridge, England)*, **127**, 225–35.
- Reijntjes, S., Blentic, A., Gale, E., and Maden, Malcolm** (2005). The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Developmental biology*, **285**, 224–37.
- Reim, G. and Brand, Michael** (2002). Spiel-ohne-grenzen/pou2 mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 917–33.
- Rhinn, Muriel, Lun, K., Amores, Angel, Yan, Y.-L., Postlethwait, J. H., and Brand, Michael** (2003). Cloning, expression and relationship of zebrafish gbx1 and gbx2 genes to Fgf signaling. *Mechanisms of development*, **120**, 919–36.
- Rijli, F M, Gavalas, A, and Chambon, P** (1998). Segmentation and specification in the branchial region of the head: the role of the Hox selector genes. *The International journal of developmental biology*, **42**, 393–401.
- 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, Filippo M, Gavalas, Anthony, and Chambon, Pierre** (1998). Segmentation and specification in the branchial region of the head : the role of the Hox selector genes. **401**, 393–401.
- Riley, B. B., Chiang, M.-Y., Storch, E. M., Heck, R., Buckles, G. R., and Lekven, A. C.** (2004). Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metamer patterning in the zebrafish hindbrain. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **231**, 278–91.
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., et al.** (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, **129**, 1311–23.
- Di Rocco, G., Gavalas, A, Popperl, H., Krumlauf, R, Mavilio, F., and Zappavigna, V.** (2001). The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 20506–15.
- Roehl, H. and Nüsslein-Volhard, C.** (2001). Zebrafish pea3 and erm are general targets of FGF8 signaling. *Current biology: CB*, **11**, 503–7.

- Rohrschneider, M. R., Elsen, G. E., and Prince, Victoria E** (2007). Zebrafish Hoxb1a regulates multiple downstream genes including prickle1b. *Developmental biology*, **309**, 358–72.
- 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 (Cambridge, England)*, **126**, 5027–40.
- Rowitch, D. H., Lu, Q. R., Kessar, N., and Richardson, W. D.** (2002). An “oligarchy” rules neural development. *Trends in neurosciences*, **25**, 417–22.
- Roy, N. M. and Sagerström, Charles G** (2004). An early Fgf signal required for gene expression in the zebrafish hindbrain primordium. *Brain research. Developmental brain research*, **148**, 27–42.
- Runko, A. P. and Sagerström, Charles G** (2004). Isolation of nlz2 and characterization of essential domains in Nlz family proteins. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 11917–25.
- Runko, A. P. and Sagerström, Charles G** (2003). Nlz belongs to a family of zinc-finger-containing repressors and controls segmental gene expression in the zebrafish hindbrain. *Developmental Biology*, **262**, 254–267.
- Russo, M. W., Severson, B. R., and Milbrandt, J.** (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6873–7.
- Sadl, V. S., Sing, A., Mar, L., Jin, F., and Cordes, Sabine P** (2003). Analysis of hindbrain patterning defects caused by the kreisler(enu) mutation reveals multiple roles of Kreisler in hindbrain segmentation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **227**, 134–42.
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushima, Youichi, Tamura, M., and Shiroishi, T.** (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 797–803.
- Saldivar, J. R., Sechrist, J. W., Krull, C. E., Ruffins, S., and Bronner-Fraser, M.** (1997). Dorsal hindbrain ablation results in rerouting of neural crest migration and changes in gene expression, but normal hyoid development. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 2729–39.
- Salzberg, A., Elias, S, Nachaliel, N., Bonstein, L., Henig, C., and Frank, D** (1999). A Meis family protein caudalizes neural cell fates in Xenopus. *Mechanisms of development*, **80**, 3–13.
- Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., and Hume, D. A.** (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 424–36.
- Santagati, F. and Rijli, Filippo M** (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature reviews. Neuroscience*, **4**, 806–18.
- Sasai, Y., Kageyama, R, Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S.** (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes & development*, **6**, 2620–34.

- Sasai, Y., Lu, B., Piccolo, S., and De Robertis, E. M.** (1996). Endoderm induction by the organizer-secreted factors chordin and noggin in *Xenopus* animal caps. *The EMBO journal*, **15**, 4547–55.
- Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D. L., Rangini, Z., et al.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development (Cambridge, England)*, **123**, 165–78.
- Schier, A., Neuhauss, S., Harvey, M., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stainier, D., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Stemple, D., Rangini, Z., et al.** (1996). Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development*, **123**, 165–178.
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P., and Lumsden, A** (1997). Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of Krox-20 mouse mutants. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 1215–26.
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitandou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., and Charnay, P** (1993). Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell*, **75**, 1199–214.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N. F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J. A., Umlauf, D., Dimitrova, D. S., et al.** (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nature genetics*, **42**, 53–61.
- Schonemann, M. D., Ryan, A. K., Erkman, L., McEvelly, R. J., Bermingham, J., and Rosenfeld, M. G.** (1998). POU domain factors in neural development. *Advances in experimental medicine and biology*, **449**, 39–53.
- Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.-Y., Barski, A., Wang, Zhibin, Wei, G., and Zhao, K.** (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, **132**, 887–98.
- Schröder, C., Tautz, D., Seifert, E., and Jäckle, H.** (1988). Differential regulation of the two transcripts from the *Drosophila* gap segmentation gene hunchback. *The EMBO journal*, **7**, 2881–7.
- Schug, J., Schuller, W.-P., Kappen, C., Salbaum, J. M., Bucan, Maja, and Stoeckert, C. J.** (2005). Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy. *Genome biology*, **6**, R33.
- Schulz, W. A., Steinhoff, C., and Florl, A. R.** (2006). Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current topics in microbiology and immunology*, **310**, 211–50.
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X.-Y., Bourgon, R., Biggin, M., and Pirrotta, V.** (2006). Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics*, **38**, 700–5.
- Schwartz, Y. B. and Pirrotta, V.** (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 9–22.
- Schöler, H R, Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Suzuki, N., and Gruss, P.** (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO journal*, **8**, 2543–50.

- Sechrist, J., Serbedzija, G. N., Scherson, T., Fraser, S. E., and Bronner-Fraser, M.** (1993). Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation. *Development (Cambridge, England)*, **118**, 691–703.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I. K., Wang, J.-P. Z., and Widom, J.** (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature*, **442**, 772–8.
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D G, and Charnay, P** (1997). Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain. *Mechanisms of development*, **65**, 31–42.
- Serbedzija, G. N., Bronner-Fraser, M., and Fraser, S. E.** (1992). Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, **116**, 297–307.
- Serls, A. E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J. M., and Deutsch, G. H.** (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 35–47.
- Serpente, P., Tümpel, S., Ghyselink, N. B., Niederreither, Karen, Wiedemann, L. M., Dollé, Pascal, Chambon, Pierre, Krumlauf, Robb, and Gould, A. P.** (2005). Direct crossregulation between retinoic acid receptor {beta} and Hox genes during hindbrain segmentation. *Development (Cambridge, England)*, **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.
- Shatkin, A. J. and Manley, J. L.** (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nature structural biology*, **7**, 838–42.
- Shi, Yujiang, Sawada, J., Sui, G., Affar, E. B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P.-S., Nakatani, Y., and Shi, Yang** (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, **422**, 735–8.
- Shih, J. and Fraser, S. E.** (1996). Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development (Cambridge, England)*, **122**, 1313–22.
- Shimizu, T., Bae, Y.-K., and Hibi, M.** (2006). Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 4709–19.
- Silverstein, R. A. and Ekwall, K.** (2005). Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Current genetics*, **47**, 1–17.
- Simeone, A., Acampora, D., Arcioni, L., Andrews, P. W., Boncinelli, E., and Mavilio, F.** (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature*, **346**, 763–6.
- Simeone, A., Acampora, D., Nigro, V., Faiella, A., D’Esposito, M., Stornaiuolo, A., Mavilio, F., and Boncinelli, E.** (1991). Differential regulation by retinoic acid of the homeobox genes of the four HOX loci in human embryonal carcinoma cells. *Mechanisms of development*, **33**, 215–27.
- Simon, J. A. and Kingston, R. E.** (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**, 697–708.

- Sims, R. J., Chen, C.-F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S. S., and Reinberg, D.** (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 41789–92.
- Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Lipshitz, H. D., and Cordes, Sabine P** (2009). A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell*, **138**, 885–97.
- Sirbu, I. O., Gresh, L., Barra, Jacqueline, and Duester, G.** (2005). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 2611–22.
- Skromne, I., Thorsen, D., Hale, M., Prince, Victoria E, and Ho, Robert K** (2007). Repression of the hindbrain developmental program by Cdx factors is required for the specification of the vertebrate spinal cord. *Development (Cambridge, England)*, **134**, 2147–58.
- Smale, S. T. and Kadonaga, J. T.** (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry*, **72**, 449–79.
- Smith, J. L. and Schoenwolf, G C** (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in neurosciences*, **20**, 510–7.
- Song, H. K., Hong, S.-E., Kim, T., and Kim, D. H.** (2012). Deep RNA sequencing reveals novel cardiac transcriptomic signatures for physiological and pathological hypertrophy. *PloS one*, **7**, e35552.
- Song, S.-H., Kim, A., Ragoczy, T., Bender, M. A., Groudine, M., and Dean, A.** (2010). Multiple functions of Ldb1 required for beta-globin activation during erythroid differentiation. *Blood*, **116**, 2356–64.
- Spemann, H. and Mangold, H.** (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923. *The International journal of developmental biology*, **45**, 13–38.
- Stedman, A., Lecaudey, Virginie, Havis, E., Anselme, I., Wassef, Michel, Gilardi-Hebenstreit, Pascale, and Schneider-Maunoury, Sylvie** (2009). A functional interaction between Irx and Meis patterns the anterior hindbrain and activates krox20 expression in rhombomere 3. *Developmental biology*, **327**, 566–77.
- Stern, C D** (2001). Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nature reviews. Neuroscience*, **2**, 92–8.
- Stern, Claudio D** (2005). Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 2007–21.
- Struhl, K, Kadosh, D., Keaveney, M., Kuras, L., and Moqtaderi, Z.** (1998). Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, **63**, 413–21.
- Struhl, Kevin** (2005). Transcriptional activation: mediator can act after preinitiation complex formation. *Molecular cell*, **17**, 752–4.
- 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 (Cambridge, England)*, **125**, 1025–36.

- Studer, M., Lumsden, A., Ariza-McNaughton, L., Bradley, A., and Krumlauf, R** Altered segmental identity and abnormal migration of motor neurons in mice lacking Hoxb-1. *Nature*, **384**, 630–4.
- Sturgeon, K., Kaneko, T., Biemann, M., Gauthier, A., Chawengsaksophak, K., and Cordes, Sabine P** (2011). Cdx1 refines positional identity of the vertebrate hindbrain by directly repressing Mafb expression. *Development (Cambridge, England)*, **138**, 65–74.
- 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.
- Sultan, M., Schulz, M. H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., et al.** (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science (New York, N.Y.)*, **321**, 956–60.
- Sun, Z and Hopkins, N** (2001). vhnf1, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes & development*, **15**, 3217–29.
- Sun, Zhihui, Shi, K., Su, Y., and Meng, A.** (2002). A novel zinc finger transcription factor resembles krox-20 in structure and in expression pattern in zebrafish. *Mechanisms of development*, **114**, 133–5.
- Sun, Zhihui, Zhao, J., Zhang, Yu, and Meng, A.** (2006). Sp51 is a mediator of Fgf signals in anteroposterior patterning of the neuroectoderm in zebrafish embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**, 2999–3006.
- Suske, G.** (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene*, **238**, 291–300.
- Sutherland, H. and Bickmore, W. A.** (2009). Transcription factories: gene expression in unions? *Nature reviews. Genetics*, **10**, 457–66.
- Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Allen, P. B., Moine, C. L., Lindskog, M., Fisone, G., Greengard, P., and Fredholm, B. B.** (2000). Dopamine D(1) receptor-induced gene transcription is modulated by DARPP-32. *Journal of neurochemistry*, **75**, 248–57.
- Taatjes, D. J., Marr, M. T., and Tjian, Robert** (2004). Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **5**, 403–10.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A.** (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic acids research*, **40**, W478–83.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–76.
- Takeda, H, Matsuzaki, T., Oki, T., Miyagawa, T., and Amanuma, H.** (1994). A novel POU domain gene, zebrafish pou2: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development. *Genes & development*, **8**, 45–59.
- Tallafuss, A., Wilm, T. P., Crozatier, M., Pfeffer, P., Wassef, M, and Bally-Cuif, L** (2001). The zebrafish buttonhead-like factor Bts1 is an early regulator of pax2.1

- expression during mid-hindbrain development. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 4021–34.
- Tarchini, B., Huynh, T. H. N., Cox, G. A., and Duboule, Denis** (2005). HoxD cluster scanning deletions identify multiple defects leading to paralysis in the mouse mutant Ironside. *Genes & development*, **19**, 2862–76.
- Taylor, J. K., Levy, T., Suh, E. R., and Traber, P. G.** (1997). Activation of enhancer elements by the homeobox gene Cdx2 is cell line specific. *Nucleic acids research*, **25**, 2293–300.
- Theil, T., Frain, M, Gilardi-Hebenstreit, P, Flenniken, A., Charnay, P, and Wilkinson, D G** (1998). Segmental expression of the EphA4 (Sek-1) receptor tyrosine kinase in the hindbrain is under direct transcriptional control of Krox-20. *Development (Cambridge, England)*, **125**, 443–52.
- Thomas, M. C. and Chiang, C.-M.** The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **41**, 105–78.
- Tian, D., Sun, S., and Lee, J. T.** (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, **143**, 390–403.
- Timmers, H. T. M. and Tora, L.** (2005). SAGA unveiled. *Trends in biochemical sciences*, **30**, 7–10.
- Topilko, P, Schneider-Maunoury, S, Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C., and Charnay, P** (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, **371**, 796–9.
- Toung, J. M., Morley, M., Li, M., and Cheung, V. G.** (2011). RNA-sequence analysis of human B-cells. *Genome research*, **21**, 991–8.
- Toyoda, R., Assimacopoulos, S., Wilcoxon, J., Taylor, A., Feldman, P., Suzuki-Hirano, A., Shimogori, T., and Grove, Elizabeth A** (2010). FGF8 acts as a classic diffusible morphogen to pattern the neocortex. *Development (Cambridge, England)*, **137**, 3439–48.
- Trainor, P A and Krumlauf, R** (2000). Patterning the cranial neural crest: hindbrain segmentation and Hox gene plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, **1**, 116–24.
- Trainor, Paul A, Sobieszczuk, D., Wilkinson, David, and Krumlauf, Robb** (2002). Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development (Cambridge, England)*, **129**, 433–42.
- Turki-Judeh, W. and Courey, Albert J** (2012). Groucho: a corepressor with instructive roles in development. *Current topics in developmental biology*, **98**, 65–96.
- Tümpel, S., Cambronero, F., Ferretti, Elisabetta, Blasi, Francesco, Wiedemann, L. M., and Krumlauf, Robb** (2007). Expression of Hoxa2 in rhombomere 4 is regulated by a conserved cross-regulatory mechanism dependent upon Hoxb1. *Developmental biology*, **302**, 646–60.
- Tümpel, S., Cambronero, F., Sims, C., Krumlauf, Robb, and Wiedemann, L. M.** (2008). A regulatory module embedded in the coding region of Hoxa2 controls expression in rhombomere 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 20077–82.
- Tümpel, S., Wiedemann, L. M., and Krumlauf, Robb** (2009). Hox genes and segmentation of the vertebrate hindbrain. *Current topics in developmental biology*, **88**, 103–37.

- Urness, L. D., Paxton, C. N., Wang, X., Schoenwolf, Gary C, and Mansour, S. L.** (2010). FGF signaling regulates otic placode induction and refinement by controlling both ectodermal target genes and hindbrain Wnt8a. *Developmental biology*, **340**, 595–604.
- Vakoc, C. R., Letting, D. L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M. A., Groudine, M., Weiss, M. J., Dekker, J., and Blobel, G. A.** (2005). Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Molecular cell*, **17**, 453–62.
- Vermeren, M., Maro, G. S., Bron, R., McGonnell, I. M., Charnay, Patrick, Topilko, Piotr, and Cohen, J.** (2003). Integrity of developing spinal motor columns is regulated by neural crest derivatives at motor exit points. *Neuron*, **37**, 403–15.
- Vesque, C. and Charnay, P** (1992). Mapping functional regions of the segment-specific transcription factor Krox-20. *Nucleic acids research*, **20**, 2485–92.
- 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. *The EMBO journal*, **15**, 5383–96.
- Vlachakis, N, Choe, S. K., and Sagerström, C G** (2001). Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 1299–312.
- Vlachakis, N, Ellstrom, D. R., and Sagerström, C G** (2000). A novel pbx family member expressed during early zebrafish embryogenesis forms trimeric complexes with Meis3 and Hoxb1b. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **217**, 109–19.
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C, Kress, C., Buart, S., Charnay, P, and Schneider-Maunoury, S** (2001). Hindbrain patterning: Krox20 couples segmentation and specification of regional identity. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 4967–78.
- WADDINGTON, C. H.** (1950). Processes of induction in the early development of the chick. *L' Année biologique*, **54**, 711–7.
- Walshe, J., Maroon, H., McGonnell, I. M., Dickson, C., and Mason, Ivor** (2002). Establishment of hindbrain segmental identity requires signaling by FGF3 and FGF8. *Current biology : CB*, **12**, 1117–23.
- Wang, G.-S. and Cooper, T. A.** (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature reviews. Genetics*, **8**, 749–61.
- Wang, Jianrong, Lunyak, V. V., and Jordan, I. K.** (2012). Genome-wide prediction and analysis of human chromatin boundary elements. *Nucleic acids research*, **40**, 511–29.
- Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Yong, Lajoie, B. R., Protacio, A., Flynn, R. A., Gupta, R. A., et al.** (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, **472**, 120–4.
- Wang, M., Bao, Y.-L., Wu, Y., Yu, C.-L., Meng, X.-Y., Huang, Y.-X., Sun, Y., Zheng, L.-H., and Li, Y.-X.** (2010). Basic FGF downregulates TSP50 expression via the ERK/Sp1 pathway. *Journal of cellular biochemistry*, **111**, 75–81.

- Wang, Q., Carroll, J. S., and Brown, M.** (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Molecular cell*, **19**, 631–42.
- Wang, Zhong, Gerstein, M., and Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, **10**, 57–63.
- Waskiewicz, A J, Rikhof, H A, Hernandez, R E, and Moens, C B** (2001). Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development (Cambridge, England)*, **128**, 4139–51.
- Waskiewicz, Andrew Jan, Rikhof, Holly A, and Moens, Cecilia B** (2002). Eliminating zebrafish pbx proteins reveals a hindbrain ground state. *Developmental cell*, **3**, 723–33.
- Waskiewicz, Andrew Jan, Rikhof, Holly A., and Moens, Cecilia B.** (2002). Eliminating Zebrafish Pbx Proteins Reveals a Hindbrain Ground State. *Developmental Cell*, **3**, 723–733.
- Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S., and Martin, G. R.** (1997). Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development (Cambridge, England)*, **124**, 2923–34.
- Wassef, Michel a, Chomette, D., Pouilhe, M., Stedman, A., Havis, E., Desmarquet-Trin Dinh, C., Schneider-Maunoury, Sylvie, Gilardi-Hebenstreit, Pascale, Charnay, Patrick, and Ghislain, Julien** (2008). Rostral hindbrain patterning involves the direct activation of a Krox20 transcriptional enhancer by Hox/Pbx and Meis factors. *Development (Cambridge, England)*, **135**, 3369–78.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A.** (1993). The Ets family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS*, **211**, 7–18.
- Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J., and Moon, Randall T** (2005). The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/beta-catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Current biology : CB*, **15**, 489–500.
- Weisinger, K., Kayam, G., Missulawin-Drillman, T., and Sela-Donenfeld, D.** (2010). Analysis of expression and function of FGF-MAPK signaling components in the hindbrain reveals a central role for FGF3 in the regulation of Krox20, mediated by Pea3. *Developmental biology*, **344**, 881–95.
- Welsh, I. C. and O'Brien, T. P.** (2000). Loss of late primitive streak mesoderm and interruption of left-right morphogenesis in the Ednrb(s-1Acrq) mutant mouse. *Developmental biology*, **225**, 151–68.
- Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y., Irizarry, R. A., and Feinberg, A. P.** (2009). Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nature genetics*, **41**, 246–50.
- Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T., et al.** (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, **451**, 796–801.

- Wernig, M., Meissner, Alexander, Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, Rudolf** (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, **448**, 318–24.
- Weston, A. D., Blumberg, B., and Underhill, T. M.** (2003). Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more. *The Journal of cell biology*, **161**, 223–8.
- White, J. C., Highland, M., Kaiser, M., and Clagett-Dame, M.** (2000). Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Developmental biology*, **220**, 263–84.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2004). Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **229**, 393–9.
- Wiellette, E. L. and Sive, H.** (2003). vhnf1 and Fgf signals synergize to specify rhombomere identity in the zebrafish hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **130**, 3821–9.
- Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C. J., Rogers, J., and Bähler, J.** (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, **453**, 1239–43.
- Wilkinson, D G, Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charnay, P** (1989). Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature*, **337**, 461–4.
- 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.
- Williams, A., Spilianakis, C. G., and Flavell, R. A.** (2010). Interchromosomal association and gene regulation in trans. *Trends in genetics : TIG*, **26**, 188–97.
- Wilson, P. A. and Hemmati-Brivanlou, A.** (1995). Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, **376**, 331–3.
- Wittkopp, P. J. and Kalay, G.** (2012). Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nature reviews. Genetics*, **13**, 59–69.
- Woo, C. J., Kharchenko, P. V., Daheron, L., Park, P. J., and Kingston, R. E.** (2010). A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell*, **140**, 99–110.
- Xie, X., Mikkelsen, T. S., Gnirke, A., Lindblad-Toh, K., Kellis, M., and Lander, E. S.** (2007). Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 7145–50.
- Xue, X. D., Kimura, W., Wang, B., Hikosaka, K., Itakura, T., Uezato, T., Matsuda, M., Koseki, H., and Miura, N.** (2010). A unique expression pattern of Tbx10 in the hindbrain as revealed by Tbx10(LacZ) allele. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, **48**, 295–302.
- Yan, G. Z. and Ziff, E. B.** (1997). Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription

- factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **17**, 6122–32.
- Yang, J. and Corces, V. G.** (2011). Chromatin insulators: a role in nuclear organization and gene expression. *Advances in cancer research*, **110**, 43–76.
- Yang, J. and Corces, V. G.** (2012). Insulators, long-range interactions, and genome function. *Current opinion in genetics & development*, **22**, 86–92.
- Yang, X.-J. and Seto, E.** (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, **26**, 5310–8.
- Yee, S. P. and Rigby, P. W.** (1993). The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes & development*, **7**, 1277–89.
- Yoda, H., Momoi, A., Esguerra, C. V., Meyer, D., Driever, Wolfgang, Kondoh, H., and Furutani-Seiki, Makoto** (2003). An expression pattern screen for genes involved in the induction of the posterior nervous system of zebrafish. *Differentiation; research in biological diversity*, **71**, 152–62.
- Yoo, J., Jeong, M.-J., Kwon, B.-M., Hur, M.-W., Park, Y.-M., and Han, M. Y.** (2002). Activation of dynamin I gene expression by Sp1 and Sp3 is required for neuronal differentiation of N1E-115 cells. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 11904–9.
- Zaret, K. S. and Carroll, J. S.** (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & development*, **25**, 2227–41.
- Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D., and Kouzarides, T.** (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) repressor complex. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 11621–4.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.-W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., and Young, R. A.** (2007). RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nature genetics*, **39**, 1512–6.
- Zeng, W., Ball, A. R., and Yokomori, K.** (2010). HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, **5**, 287–92.
- Zerucha, T. and Prince, V E** (2001). Cloning and developmental expression of a zebrafish *meis2* homeobox gene. *Mechanisms of development*, **102**, 247–50.
- Zhang, M., Kim, H. J., Marshall, H, Gendron-Maguire, M., Lucas, D. A., Baron, A., Gudas, L. J., Gridley, T., Krumlauf, R, and Grippo, J. F.** (1994). Ectopic *Hoxa-1* induces rhombomere transformation in mouse hindbrain. *Development (Cambridge, England)*, **120**, 2431–42.
- Zhang, Xiuqin, Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D. M.** (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 15694–700.
- Zhao, C. and Meng, A.** (2005). Sp1-like transcription factors are regulators of embryonic development in vertebrates. *Development, growth & differentiation*, **47**, 201–11.
- Zhao, H. and Dean, A.** (2004). An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucleic acids research*, **32**, 4903–19.

- Zhao, J., Cao, Y., Zhao, C., Postlethwait, J., and Meng, A.** (2003). An SP1-like transcription factor Spr2 acts downstream of Fgf signaling to mediate mesoderm induction. *The EMBO journal*, **22**, 6078–88.
- Zhou, V. W., Goren, A., and Bernstein, B. E.** (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature reviews. Genetics*, **12**, 7–18.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S.** (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, **456**, 125–9.
- Ørom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., Lai, F., Zytnicki, M., Notredame, C., Huang, Q., et al.** (2010). Long Noncoding RNAs with Enhancer-like Function in Human Cells. *Cell*, **143**, 46–58.