



**HAL**  
open science

# Contrôle spatio-temporel de l'activité de l'acide rétinolique dans le rhombencephale du poisson zèbre

Lijun Xu

► **To cite this version:**

Lijun Xu. Contrôle spatio-temporel de l'activité de l'acide rétinolique dans le rhombencephale du poisson zèbre. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66550 . tel-00836933

**HAL Id: tel-00836933**

**<https://theses.hal.science/tel-00836933>**

Submitted on 21 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**

Ecole Doctorale "Complexité du vivant" - ED515

Présentée par

**Lijun XU**

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris 6

**Sujet :**

**Contrôle spatio-temporel de l'activité de l'acide rétinoïque dans le  
rhombencephale du poisson zèbre**

**Soutenue le 9 novembre 2012 devant le jury composé de :**

<b>Dr. Sylvie Schneider-Maunoury</b>	<b>Président</b>
<b>Dr. David Bensimon</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Dr. Gil Levkowitz</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Petronella Kettunen</b>	<b>Rapportrice</b>
<b>Dr. Nadine Peyriéras</b>	<b>Examinatrice</b>

## Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Physique Statistique et au Département de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure dirigés par Dr. Eric Pérez et Prof. Ludovic Jullien respectivement. Je les remercie sincèrement de m'avoir accueillie dans leur institution.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du Jury. Dr. Sylvie Schneider-Maunoury, directrice de recherche à l'Université Paris 6 et Dr. Nadine Peyriéras, directrice de recherche à l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard ont accepté d'être président du jury et examinatrice respectivement. Dr. Gil Levkowitz, directeur de recherche à l'Institut Weizmann et Dr. Petronella Kettunen, chercheuse à l'Institut de Neurosciences et Physiologie de l'Université de Gothenburg ont accepté d'être rapporteurs externes de cette thèse et sont venus à Paris pour ma soutenance malgré leur emploi du temps très chargé.

Un immense merci à Dr. David Bensimon et Prof. Ludovic Jullien qui m'ont encadrée pendant ces quatre dernières années. C'est une grande chance de travailler sur un projet multidisciplinaire, comprenant biologie, chimie et physique. J'ai beaucoup appris dans leur côté. Merci à David pour tout. Pour ton soutien, ta vision large et surtout tes idées extraordinaires. Merci à Ludovic pour ta détermination, tes encouragements, ton écoute et tes conseils toujours très utiles. C'est difficile de trouver les mots justes pour exprimer mon remerciement. En Chine, on dit : un jour prof, toujours père. Je vous respecte profondément.

Je tiens à remercier Dr. Sophie Vríz qui m'a introduit dans le monde du poisson zèbre. Merci pour tes conseils, ta patience ainsi que ton expérience irremplaçable. Je voudrais également remercier Carole Gauron de m'avoir appris la technique d'injection de poisson.

Merci à tous les membres du laboratoire et les secrétaires. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien. En particulier Isabelle pour ta générosité et ton énorme contribution à la vie du labo. Thomas et Kais pour avoir été mes voisins pendant quatre ans et pour votre bon humour du quotidien. Jean-François pour ta passion dans la recherche aussi bien que dans la cuisine. C'est un grand chef à côté de sa fonction de scientifique. Fangyuan pour ton amitié, j'espère que tout ira bien pour toi dans ton nouveau labo.

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de collaborer avec Dr. Rob Phillips à Caltech et Dr. Shimon Weiss à UCLA. Ces expériences furent très enrichissantes. En particulier, Dr. Rob Phillips m'a donné tout le nécessaire pour que le travail soit fait dans les meilleures conditions. Je voudrais remercier Arbel Tadmor pour son aide précieuse dans le RT-qPCR sur le système Fluidigm. Malgré sa forte personnalité, Arbel a une grande qualité scientifique. Sa bienveillance et son esprit critique m'ont beaucoup marquée.

Je voudrais remercier sincèrement l'ensemble des membres de l'équipe Rosa et Charnay. En particulier Michel et Patricia. Michel m'a appris la technique d'hybridation *in situ* de A à Z. Patricia m'a beaucoup aidé pour la synthèse des sondes, cela était crucial pour la resoumission de mon article. Michel est spécialisé dans la segmentation du rhombencéphale tandis que Patricia est aussi une experte de RA et du rhombencéphale. Les discussions que j'ai eu avec eux m'ont beaucoup inspirée. C'était un plaisir de travailler avec Michel et Patricia, ils sont toujours prêts à donner un coup de main. Je voudrais remercier Charlotte, Yassine, Sylvain, Julien, Guillaume et Virginie pour les discussions sympathiques et leurs conseils avisés.

Un grand remerciement à Lydie et Thao d'avoir accepté de relire ma thèse. J'avoue que depuis mon master, mon niveau de français n'a pas énormément progressé. Je vais faire des efforts, promis !

Je tiens à remercier tous mes amis pour leur soutien et compagnie. Vous êtes toujours à mes côtés pendant les moments joyeux ou difficiles. Alice, Fangyuan, Lydie, Lianmei, Shujia, Thao, Yun, Xiaoming, Florie, Zhitao et beaucoup d'autres.

Enfin, merci à mes parents et à toute ma famille, qui m'ont toujours soutenue, encouragée et m'ont constamment apporté leur amour.

## Résumé

L'objectif de ma thèse est d'étudier chez l'embryon de poisson zèbre le contrôle spatio-temporel de l'expression génétique induit par l'acide rétinoïque (RA). L'acide rétinoïque est un morphogène dérivé de la vitamine A qui est impliqué dans de nombreux processus lors du développement embryonnaire. Chez les vertébrés, cette molécule joue un rôle crucial dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral ainsi que dans la segmentation du rhombocéphale (cerveau postérieur ou hindbrain) entre autre par la formation d'un gradient antéro-postérieur qui donne lieu à une expression différenciée des gènes Hox.

Les isomères naturels de l'acide rétinoïque tel que all-trans retinoic acid (ATRA), 9-cis RA et 13-cis RA font partie de la voie de signalisation de RA. Cette voie est médiée par 2 sous-types de récepteurs nucléaires: RAR et RXR agissent comme des facteurs de transcription. Les isomères de l'acide rétinoïque possèdent des affinités différentes pour les 2 types de récepteur. Le 9-cis RA est capable de se lier avec RARs ou RXRs. Le ATRA est la forme principale de l'acide rétinoïque dans l'organisme vivant, Il est le ligand des RAR. Le 13-cis RA est aussi capable de se lier avec RAR mais son affinité est très faible par rapport au ATRA. Grâce à cette faible affinité aux RAR, le 13-cis RA a été utilisé pour traiter l'acné et la leucémie afin de minimiser les effets tératogènes de ATRA. In vitro, Le 13-cis RA est capable de s' isomériser rapidement en ATRA après illumination par UV. Cette isomérisation est aussi possible dans le sens inverse c'est-à-dire qu'on peut illuminer l'ATRA pour le transformer en 13-cis RA. Grâce à cette propriété chimique de l'acide rétinoïque, J'ai pu développer une méthode qui permet d'activer ou d'inactiver l'acide rétinoïque par illumination aux UV avec une grande résolution spatio-temporelle dans un organisme vivant.

# Abstract

The aim of my thesis is to study the spatio-temporal control of gene expression induced by retinoic acid (RA) in the zebrafish embryo. Retinoic acid is a morphogen derivative of vitamin A, which is involved in many processes during embryonic development. In vertebrates, this molecule plays a crucial role in the establishment of the anterior-posterior and dorsal-ventral axis as well as the segmentation of hindbrain by the formation of a gradient antero-posterior resulting in differential expression of Hox genes.

The natural isomers of retinoic acid such as all-trans retinoic acid (ATRA) and 9-cis RA 13-cis RA are part of the signaling pathway of RA. This pathway is mediated by two subtypes of nuclear receptors: RAR and RXR act as transcription factors. Isomers of retinoic acid have different affinities for the two receptor types. The 9-cis RA is able to bind to RARs or RXRs. ATRA is the principal form of retinoic acid in the living organism, and is the ligand for RAR. 13-cis RA is also capable of binding to RAR but its affinity is very low compared to ATRA. With this low affinity for RAR, 13-cis RA has been used to treat acne and leukemia to minimize the effects teratogenic ATRA. In vitro, the 13-cis RA is able to isomerize rapidly into ATRA after UV illumination. This isomerization is also possible in the opposite direction; we can illuminate ATRA to turn it into 13-cis-RA. Using this chemical property of retinoic acid, I have developed a method that allows activation or inactivation of retinoic acid by UV illumination with high spatio-temporal resolution in a living organism





# Les questions fondamentales de la biologie du développement

Le développement d'un organisme vivant est un processus extrêmement organisé et dynamique. Ce qui est fantastique dans la biologie du développement est qu'un seul zygote est capable de développer un organisme complexe et multicellulaire. Cependant, beaucoup de questions se posent :

1. Tout d'abord, comment une seule cellule donne-t-elle naissance à une variété de cellules différenciées ?
2. De plus, quel sont les mécanismes qui contrôlent la différenciation cellulaire ?
3. Enfin, comment les cellules s'organisent-elles les unes par rapport aux autres afin de générer des tissus puis des organes formant un organisme complexe et polarisé ? Par quels signaux sont-elles guidées ? Comment les cellules interagissent entre elles ? Quelle est la dynamique des différents signaux de différenciation au cours du développement ?

Au cours de ce projet, je me suis intéressée à la compréhension de certaines des questions que je viens d'évoquer. En particulier, j'ai étudié la voie de signalisation de l'acide rétinoïque (ATRA). C'est une voie critique pour la formation du système nerveux central, de nombreux d'organes tels que le cœur et le pancréas, ainsi que pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral. J'ai étudié cette voie dans le modèle de la segmentation du rhombencéphale chez le poisson zèbre. Nous verrons que cette voie de signalisation peut être contrôlée extérieurement avec une grande précision spatio-temporelle à l'aide d'outils physico-chimiques, ce qui est très utile pour la compréhension de la dynamique de cette voie de signalisation.

# Table de Matières

<b>Chapitre 1 Le système du poisson zèbre .....</b>	<b>1</b>
1.1 Le poisson zèbre, un bon modèle pour l'étude du développement embryonnaire.....	1
1.2 Les méthodes actuelles pour la recherche sur le poisson zèbre .....	2
1.3 Les principales étapes du développement du poisson zèbre .....	11
<b>Chapitre 2 L'ATRA et sa voie de signalisation .....</b>	<b>16</b>
2.1 Histoire de la découverte du rétinol.....	17
2.2 Source alimentaire et métabolisme du rétinol.....	19
2.3 Digestion, transport et stockage .....	21
2.4 Métabolisme dans la cellule cible .....	22
2.5 Source de l'ATRA au cours du développement embryonnaire .....	24
2.6 Récepteur nucléaire de l'ATRA .....	26
2.7 Récepteur nucléaire des RARs et RXRs .....	26
2.8 Dimérisation de RAR et RXR.....	29
<b>Chapitre 3 Rôle de l'ATRA dans le développement du rhombencéphale .....</b>	<b>31</b>
3.1 L'effet d'excès ou déficit de RA sur le développement du rhombencephale .....	33
3.2 Le gradient de l'ATRA.....	34
3.3 Synthèse de l'ATRA dans le rhombencéphale .....	36
3.4 Dégradation de l'ATRA dans le rhombencéphale .....	37
3.5 L'expression dynamique du Cyp26s .....	38
3.6 Transport et stockage de RA par les CRABPs.....	40
3.7 Problématique : quelle est la nature du gradient ?.....	41
<b>Chapitre 4 L'ATRA cagé.....</b>	<b>45</b>
4.1 Outils actuels pour contrôler l'activité de la voie de signalisation de l'ATRA .....	45
4.2 Principe du décaage .....	46
4.3 L'ATRA cagé par le groupement protecteur o-nitrobenzyle .....	47
<b>Chapitre 5 Isomérisation de l'ATRA .....</b>	<b>52</b>
5.1 L'isomérisation cis/trans .....	52
5.2 L'isomérisation du 11-cis rétinol dans le cycle de la vision.....	54
5.3 Cinétique de la photoisomérisation de l'ATRA .....	56
5.4 L'isomère 9-cis RA et son rôle dans le développement du rhombencéphale.....	57
5.5 Le 13-cis RA .....	59
<b>Chapitre 6 : Introduction sur les publications.....</b>	<b>61</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>67</b>
Conclusion sur la thèse.....	67
Perspectives .....	68
<b>Article 1 .....</b>	<b>70</b>
<b>Article 2 .....</b>	<b>71</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>72</b>

# Chapitre 1 Le système du poisson zèbre

## 1.1 Le poisson zèbre, un bon modèle pour l'étude du développement embryonnaire

Pour étudier le développement précoce des vertébrés, on dispose de différents organismes modèles tels que le poulet, le xénope et la souris. L'utilisation du poisson zèbre comme organisme modèle du développement vertébré a été introduit pour la première fois en 1981 par Georges Streisinger dans des études génétiques. Ces études se sont considérablement développées en raison de nombreux avantages. Il est ainsi relativement facile d'étudier le processus de développement chez le poisson zèbre par des approches génétiques, moléculaires et embryonnaires.

Le poisson zèbre est un poisson téléoste d'eau douce, appartenant à l'ordre des *Cypriniformes* et au genre *Danio*. Originaire d'Inde et de Malaisie, il atteint adulte une taille de 4-5 cm et présente sur toute sa longueur cinq bandes bleu-acier horizontales.

En laboratoire il est élevé à 28,5°C. L'accouplement du mâle et de la femelle peut être induit par la lumière et synchronisé avec le réveil. Le male expulse les oeufs du ventre de la femelle et les féconde dans le milieu extérieur, générant ainsi une ponte de l'ordre de 150-200 oeufs en l'espace de 15 minutes. On obtient donc un grand nombre d'embryons, dans un laps de temps assez court et sans avoir à sacrifier la femelle (comme c'est le cas chez la souris). Les embryons qui se développent à partir de ces oeufs ont la particularité d'être transparents durant les premiers jours permettant l'observation de structures internes telles que le cœur, le système nerveux ou la circulation sanguine. La

transparence de l'embryon permet l'utilisation de marqueurs fluorescents pour les études de son développement. Les embryons sont aussi très utiles pour les tests de toxicologie car leur développement précoce est très rapide. Au bout de vingt-quatre heures, les principaux organes tels que le cœur et le cerveau sont déjà mis en place, l'observation des effets tératogènes est donc aisée. Par ailleurs, il est possible de réaliser des études génétiques (mutagenèse, transgénèse) grâce au temps de génération relativement court (quatre mois) (Revue de Christine A. Devine, 2003).

## **1.2 Les méthodes actuelles pour la recherche sur le poisson zèbre**

Les injections sont les plus fréquemment utilisées pour la surexpression transitoire de protéines dans les embryons. La surexpression transitoire pendant le développement précoce du poisson zèbre (jusqu'à 3 jours) est réalisée en injectant l'ARNm codant pour la protéine d'intérêt dans les embryons au cours des deux premières heures de développement.

### **Technique d'injection**

Pour induire l'expression des protéines dans chaque cellule de l'embryon, l'ARNm correspondant à une protéine particulière est injecté dans le vitellus de l'embryon au stade d'une cellule. Pour générer des embryons mosaïques, dans lesquels la protéine est exprimée dans une sous-population de cellules, l'ARNm est injecté dans un blastomère unique de l'embryon au stade 8-cellules ou à des stades ultérieurs. Une autre stratégie utilisée pour atteindre l'expression des protéines mosaïques consiste à injecter des plasmides d'ADN dans

un blastomère unique de l'embryon au stade d'une cellule ou plus tard (directement dans une cellule spécifique), mais cette approche est moins efficace et prend plus de temps pour la synthèse des protéines par rapport l'injection d'ARNm.(Fig1.1)

L'expression transitoire de protéines via une injection d'ARNm est un moyen rapide et facile d'étudier la localisation des protéines et la fonction chez le poisson zèbre dans les premiers stades de développement, mais cette approche ne convient pas lors des stades de développement plus tardifs, ou quand la protéine d'intérêt doit être exprimée en un tissu ou un type de cellule particulier.

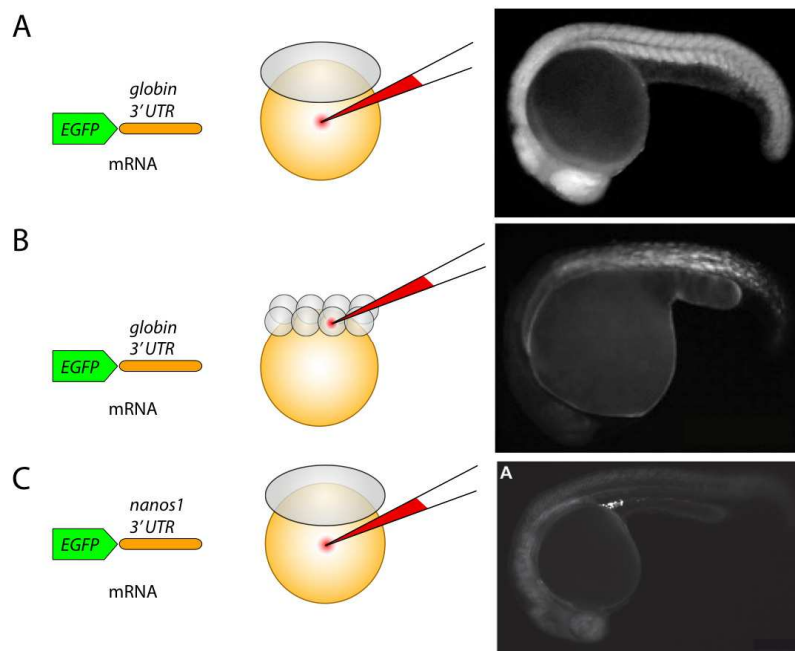


Figure1.1. Injection d'ARNm de EGFP dans l'embryon de poisson zèbre au stade précocose.

### Système Tol2 transposon

De nombreux outils transgéniques ont été adaptés à partir d'autres organismes et optimisés pour l'utilisation chez le poisson zèbre. Ces méthodes permettent l'expression protéique stable et le ciblage des protéines qui sont des conditions nécessaires pour l'expression dans les tissus définis. Le système le plus populaire pour générer des animaux transgéniques chez le poisson zèbre est le système Tol2 transposon, l'origine du poisson médaka<sup>[1][2]</sup>. La construction pour introduire l'ADN dans le génome du poisson zèbre est constituée essentiellement de deux séquences cis minimales de régulation de l'élément Tol2 positionné à l'extrémité 5' et 3' d'un promoteur minimal suivie d'une protéine fluorescente. Le vecteur contenant Tol2 est capable de recevoir des inserts d'ADN allant jusqu'à 11 kb<sup>[2]</sup> Une telle construction d'ADN est injectée, conjointement avec l'ARNm codant pour un gène de transposase, directement dans la cellule des embryons à un stade unique de cellules. Ces embryons sont élevés et les poissons adultes sont criblés pour identifier les fondateurs, dans lesquels les insertions ont été créées dans la lignée germinale qui peut être transmise à la génération suivante(Fig1.2).

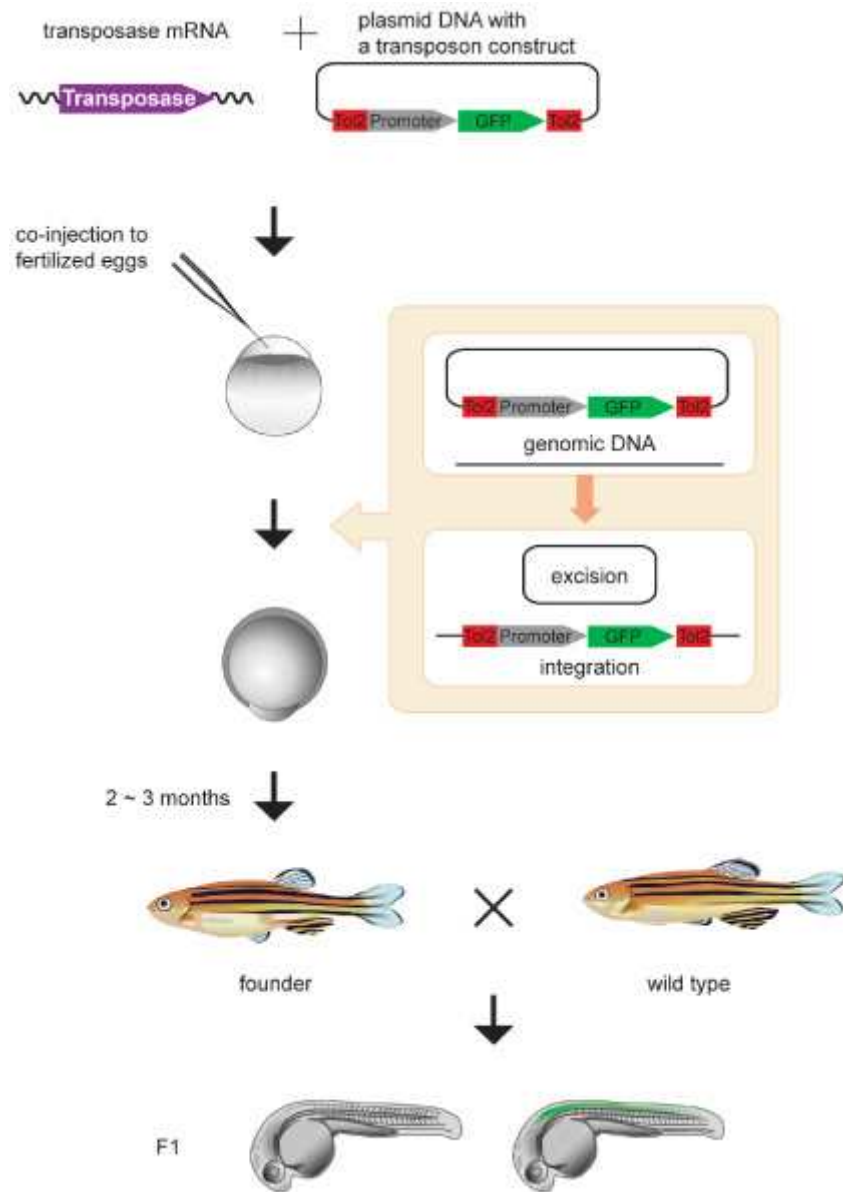


Figure 1.2. Génération du poisson zèbre en utilisant le système Tol2. Le plasmide contient le gène d'intérêt. Ce gène est situé derrière un promoteur spécifique (dans ce schéma, c'est un promoteur du moelle épinière). Ils sont entourés par deux éléments Tol2. Cette construction a été injectée avec le ARNm de Tol2 transposase dans l'embryon au stade d'une cellule. La séquence entourée par Tol2 va se détacher du plasmide et s'insérer dans le génome du fondateur. Les poissons fondateurs posséderont le gène d'intérêt intégré de manière mosaïque dans leurs cellules germinales. Le croisement entre ces fondateurs et un poisson

zèbre sauvage va générer certains poissons qui vont exprimer la protéine dans un tissu spécifiquement<sup>[2]</sup>.

### **Système Cre-lox**

La recombinaison Cre-lox est une autre stratégie pour contrôler l'expression des protéines. Elle a été récemment adaptée pour être utilisée chez le poisson zèbre<sup>[3]</sup>, la recombinaison Cre-lox permet d'induire l'expression des protéines de manière temporelle. L'expression de Cre-recombinase peut être en outre régulée par le promoteur de choc thermique permettant une grande précision spatio-temporelle d'expression de la protéine. Une telle stratégie a été utilisée dans le système MAZe pour une expression spatio-temporelle des protéines dans les embryons mosaïques<sup>[4]</sup>. Le système MAZe combine l'utilisation de Cre-recombinase exprimée sous le promoteur de choc thermique et le système GAL4/UAS adaptés pour être utilisés dans le poisson-zèbre. Après l'induction du choc thermique, la Cre-recombinase est exprimée, ce qui entraîne l'excision de la cassette encadrée par les éléments lox, permettant ainsi la synthèse de la protéine Gal4VP16 qui à son tour se lie au promoteur UAS d'entraînement de l'expression de la protéine spécifique. Cette méthode est particulièrement utile lorsque l'on veut induire l'expression de dominants négatifs des protéines dans une population sélectionnée de cellules au point de temps défini (Fig 1.3).



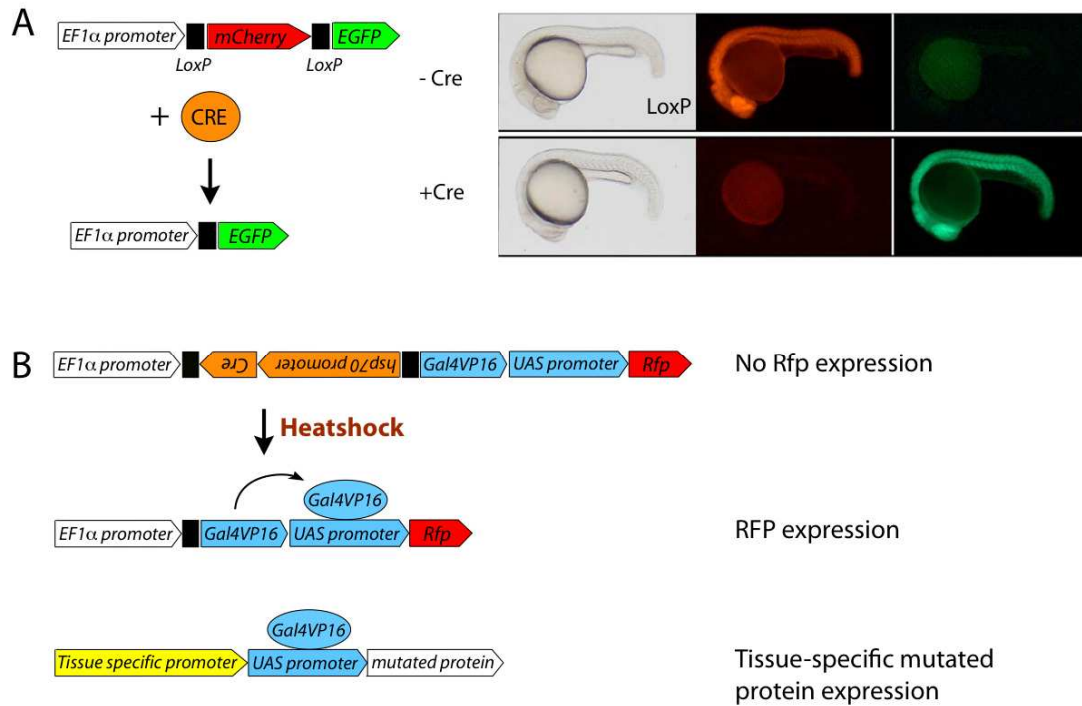


Figure 1.3. Construction du poisson transgénique en utilisant le système Cre-Lox.

A: En l'absence de Cre, le mCherry est exprimé ubiquitamment sous le promoteur EF1. En présence de Cre, la séquence de mCherry est coupée par le Cre, résultant en l'expression de EGF<sup>[3]</sup>. B: Le système MAZe permet d'induire l'expression de la protéine de manière spatio-temporelle dans l'embryon de poisson zèbre. Le gène GAL4VP16 est sous le contrôle du promoteur EF1. Le gène qui code pour la Cre recombinase est sous le contrôle de Hsp70 (heat shock promotor). Il a été inséré entre le promoteur EF1 et GAL4VP16, ce qui empêche l'expression de GAL4VP16 quand il n'y a pas de choc thermique. Le gène Rfp ne peut alors pas être exprimé. En présence de choc thermique, l'expression de Cre est induite dans une sous-population de cellules. Dans ces cellules, la cassette de gènes entre les deux sites lox est coupée, cela permet l'expression de la protéine GAL4 qui va ensuite se fixer sur le promoteur UAS. Cette fixation va induire l'expression de Rfp.

### **Mutagenèse par Tilling (targeting-induced local lesions in genomes)**

Pour réaliser une perte de fonction d'un gène chez le poisson zèbre, il n'est pas possible de recourir à la recombinaison homologe, ce qui oblige à utiliser une approche par mutagenèse aléatoire. Cette méthode a été utilisée chez le poisson zèbre lors d'un crible à grande échelle par mutagenèse ENU (Ethyl Nitroso Urée) sur mâle<sup>4</sup>. La plupart des mutants génétiques utilisés en embryologie chez le poisson zèbre ont été isolés lors de ce crible. Actuellement, une technique associant cette méthode traditionnelle de mutagenèse à un crible de gènes mutés sur échantillons d'ADN (TILLING) permet d'isoler assez rapidement une mutation pour un gène souhaité<sup>[5]</sup>(Fig1.4).

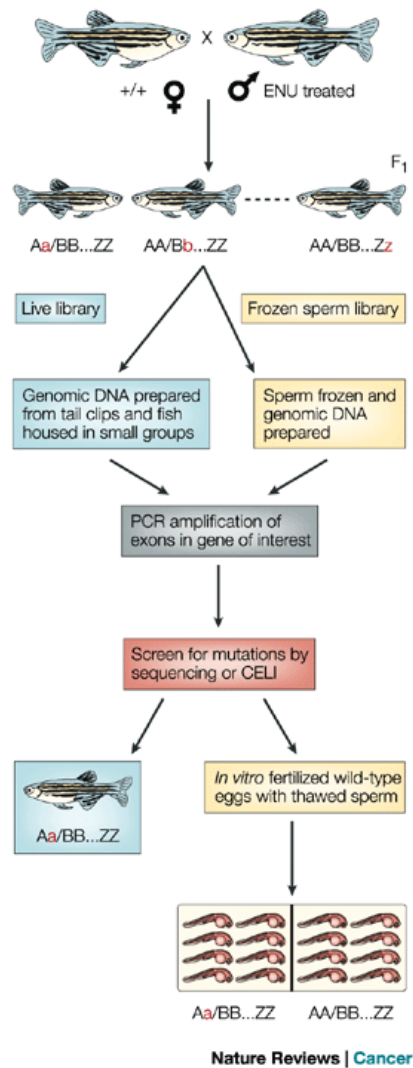


Figure 1.4. Mutagenèse par méthode de TILLING. Cette méthode permet de ‘knockout’ ou ‘knockdown’ un gène. Deux approches peuvent être utilisées pour sélectionner le mutant: une librairie vivante en coupant la queue du poisson adulte ou une librairie de sperme congelé<sup>[6]</sup>.

### Inactivation du gène par l’injection de Morpholino

Des approches complémentaires utilisant des oligonucléotides permet d’obtenir rapidement des informations concernant la perte de fonction d’un gène<sup>[7][8]</sup>. En effet, la perte de fonction du gène est réalisée par simple injection de l’oligonucléotide au stade 1-cellule.

L'approche standard pour bloquer spécifiquement la fonction d'un gène dans un embryon de poisson zèbre dans les premiers stades de développement est d'utiliser les oligonucléotides antisens modifiés appelés morpholinos<sup>[9]</sup>. Les morpholinos sont des molécules synthétiques, d'environ 25 nucléotides de longueur, et sont fournis par la société 'Gene Tools'. Deux types de morpholinos sont couramment utilisés pour interférer avec l'expression des protéines: les morpholinos ATG et les morpholinos d'épissage. Les morpholinos ATG agissent en bloquant l'initiation de la traduction des protéines à des ribosomes, résultant ainsi les embryons dépourvus d'une protéine particulière<sup>[10]</sup>. Les morpholinos d'épissage interfèrent sur la procédure d'épissage de l'ARN, résultant en la forme tronquée d'une protéine. Par conséquent, les morpholinos d'épissage pourraient être aussi bien utilisés pour étudier la fonction d'un domaine protéique particulier. Des protecteurs cibles morpholinos ont été récemment mis au point pour interférer avec la fonction des microARN endogènes (miARN) spécifiquement à leurs cibles. Ces morpholinos sont complémentaires aux séquences miARN de liaison présents dans les ARNm cibles et agissent en empêchant la liaison du miARN à sa cible, donc la stabilisation de la transcription d'ARNm<sup>[11]</sup>. De même, les morpholinos peuvent être utilisés pour inhiber la fonction des miARN directement<sup>[12]</sup>.

### **Mutagenèse dirigée par la nucléase à doigt de zinc**

Récemment, une nouvelle méthode pour induire la mutagenèse ciblée est utilisée chez le poisson zèbre : deux articles publiés en 2008 ont utilisé la nucléase à doigt de zinc (ZFN) pour créer sur les cibles les cassures bicaténares dans le génome du poisson zèbre. Dans deux études indépendantes, les auteurs ont démontré la réussite de l'utilisation de ZFN pour générer

des cassures, qui ont ensuite été réparées par une rejonction non-homologue, ce qui permet d'insérer ou de supprimer des petites séquences d'ADN (Fig. 1.5). ZFN représente une protéine de fusion chimérique comprenant une protéine à doigt de zinc (PDZ) et le domaine de clivage de l'endonucléase FokI<sup>[13]</sup>. La spécificité de liaison d'ADN est définie par la ZFP qui peut être conçue pour reconnaître une variété des séquences d'ADN cibles<sup>[14][15]</sup>. Le point crucial dans la conception de la ZFN est l'optimisation de la PDZ pour la reconnaissance de la cible<sup>[15]</sup>.

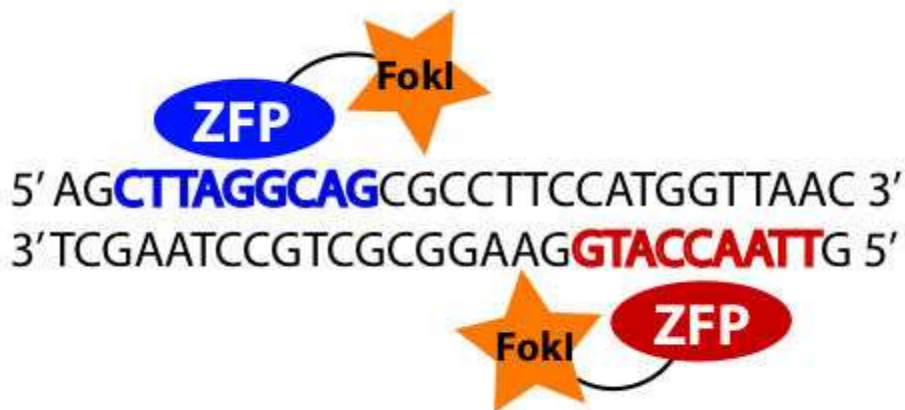


Figure 1.5. Mécanisme de la nucléase à doigt de zinc.

Chaque protéine à doigt de zinc (PDZ) permet de reconnaître une séquence d'ADN spécifique (bleue ou rouge). L'endonucléase FokI va ensuite faire le coupure sur l'ADN.

### 1.3 Les principales étapes du développement du poisson zèbre

#### La période de clivage (0h – 2,25h)

Au moment de la ponte, l'oeuf est chargé uniformément de réserves vitellines. Juste après la fécondation, un courant vitellin déforme la membrane cellulaire et crée une région dépourvue de vitellus, ce qui définit ainsi le pôle animal, établissant une polarité

animale/végétative. Initialement, les divisions cellulaires sont synchrones et orientées. Les 5 premières divisions (des stades de 1 à 32 cellules) se font dans le plan vertical et chacune d'entre elles est orientée perpendiculairement par rapport à la précédente. Par contre, la 6<sup>ème</sup> division se passe par le plan équatorial créant ainsi une 2<sup>ème</sup> couche cellulaire. Les cellules marginales restent en contact étroit avec la réserve vitelline grâce à des ponts cytoplasmiques. A partir de ce stade (64 cellules), les divisions ne sont plus orientées.

### **La blastulation (2,25h – 5,25h)**

Entre les stades 512 et 1024 cellules, le génome zygotique commence à prendre le contrôle du développement : c'est la transition mi-blastuléenne (MBT). La MBT marque la fin des divisions cellulaires synchrones. Jusqu'à cet événement, le métabolisme des cellules ainsi que les signalisations développementales étaient assurés par des molécules maternelles déposées dans le vitellus lors de l'ovogenèse. Les cellules marginales qui étaient en contact avec la réserve vitelline, fusionnent avec elle, déversant ainsi leur cytoplasme et leur noyau dans le vitellus. Ces noyaux restent à la surface de la réserve vitelline et forment la couche vitelline syncytiale (Yolk Syncytial Layer, YSL), annexe extra-embryonnaire essentielle pour l'induction du mésoderme et de l'endoderme ainsi que pour la détermination des axes embryonnaires. Les blastomères continuent à se diviser (de manière asynchrone), le blastoderme commence à recouvrir le vitellus par un mouvement d'épibolie. L'embryon se creuse en son centre pour former une sorte de casquette posée sur le vitellus. Même si en fin de stade blastula (stade 50% épibolie), seul l'axe animal - végétal est reconnaissable, l'axe dorso-ventral et les feuilletts embryonnaires sont déjà déterminés au niveau moléculaire.

### **La gastrulation (5,25h-10h)**

La gastrulation est une étape importante pour la mise en place des feuillets et des axes embryonnaires. Au cours de la gastrulation, on peut distinguer trois grands types de mouvements cellulaires : l'épibolie, l'involution et la convergence-extension.

Tout d'abord, les cellules situées les plus à la marge entre l'embryon et le vitellus involuent pour former un deuxième feuillet interne, l'hypoblaste, situé sous l'épiblaste. Les cellules hypoblastiques vont se différencier en endoderme et mésoderme. Ces mouvements d'involution sont visualisables par un épaissement de la zone marginale, appelé anneau germinatif. Dorsalement ce dernier est plus épais et constitue l'écusson embryonnaire (Shield), à l'origine du mésoderme axial, premier signe morphologique d'une dissymétrie le long de l'axe dorso-ventral. En parallèle, l'embryon continue les mouvements d'épibolie initiés lors du stade blastula pour recouvrir complètement le vitellus. En plus des mouvements d'involution et d'épibolie, les cellules subissent des mouvements complexes de convergence vers le côté dorsal et d'extension le long de l'axe animal-végétal. A l'issue de la gastrulation, les principales régions de l'embryon (axe, tête, queue) ont été mises en place et sont reconnaissables par leur morphologie.

### **La somitogenèse (10h - 24h)**

La somitogenèse est une période où les territoires définis pendant la gastrulation vont grandir et se différencier. Tout d'abord, le système nerveux central se forme à partir de la

plaque neurale dorsale pour former un tube neural par cavitation. Antérieurement, les différentes vésicules céphaliques (prosencephale, mésencéphale et rhombencéphale) se forment ainsi que les yeux.

Au niveau de l'hypoblaste dorsal, le mésoderme para-axial se segmente progressivement en somites, de l'antérieur vers le postérieur. Du côté postérieur, le bourgeon caudal, issu de la fusion de cellules marginales en fin de gastrula, se développe pour former la queue du poisson.

### **Après 24h**

Au bout de 24h de développement, l'embryon de poisson zèbre ressemble déjà à un petit poisson dont les principales structures sont reconnaissables. On peut ainsi facilement identifier le mésoderme axial (notochorde) et para-axial (somites) ainsi que le mésenchyme ventral (sang). Au niveau du système nerveux, les différentes régions du cerveau sont visualisées grâce à des repères morphologiques tels que la capsule otique (oreille) ou la barrière mésencéphale - rhombencéphale. Grâce à l'ensemble de ces caractères morphologiques, ce stade est souvent utilisé pour l'analyse phénotypique du résultat des expériences réalisées plus précocement (injections, transplantations et test de toxicologie). Le jeune poisson est autonome jusqu'à 5 jours de développement (épuisement de la réserve vitelline), moment où il a besoin d'une alimentation externe<sup>[16]</sup> (Fig 1.6).



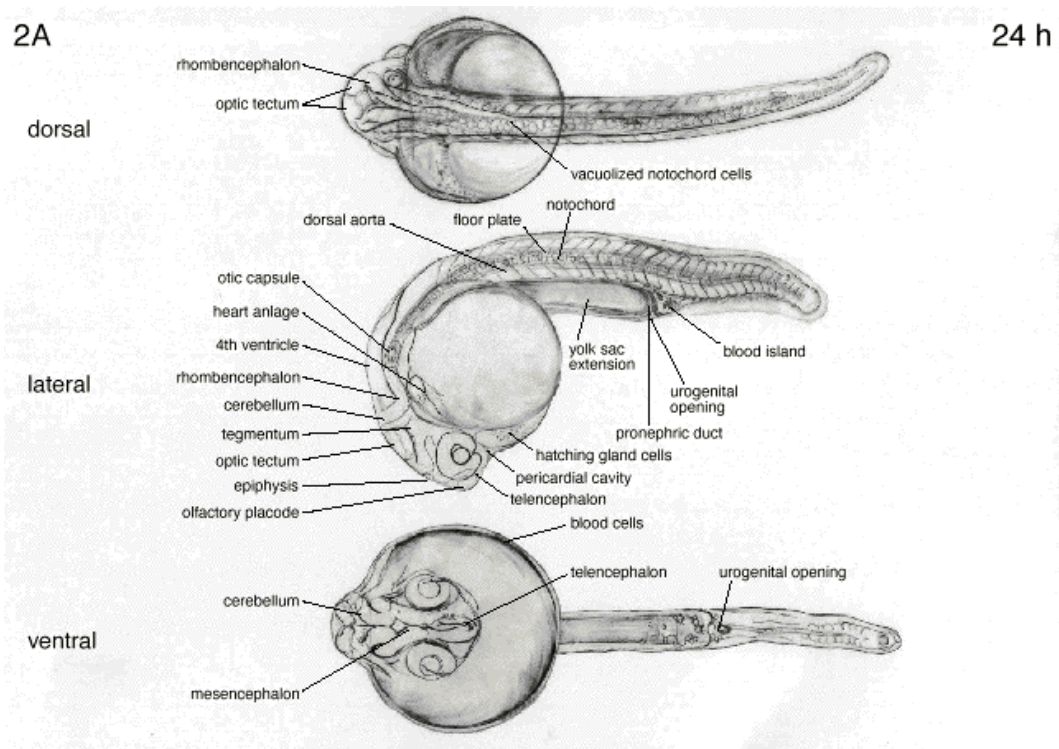


Figure 1.6. Vue dorsale, latérale et ventrale d'un embryon de poisson zèbre à 24 hpf. A ce stade, toutes les structures embryonnaires sont présentes et facilement reconnaissables grâce à la transparence du tissu.

## Chapitre 2 L'ATRA et sa voie de signalisation

L'ATRA est un morphogène essentiel impliqué dans l'embryogénèse des vertébrés. Il contrôle l'établissement du système nerveux central, de l'axe antéro-postérieur, de la symétrie gauche-droite et dorso-ventrale et du développement de nombreux organes tels que la rétine, le cœur et le pancréas. L'objectif de ce chapitre est de présenter un plan général du métabolisme et du mode d'action de l'ATRA.

L'ATRA est un métabolite issu du rétinol (vitamine A), Cette vitamine obtenue par l'alimentation subit une série de réactions enzymatiques la transformant en acide rétinoïque. Dans un premier temps, je décrirai les différentes étapes de cette transformation. L'action de l'ATRA est médiée par son interaction avec divers récepteurs nucléaires contrôlant l'expression de gènes cibles. Dans un second temps je décrirai le fonctionnement de ces récepteurs nucléaires dans la cellule. Un aspect important de l'ATRA est l'existence de différents stéréoisomères possédant une activité biologique très contrastée. Bien que l'ATRA trans soit la molécule clé de la voie RA, il existe d'autres isomères de l'ATRA possédant différents rôles biologiques (Fig 2.1). Nous verrons par ailleurs que l'activité biologique différente de ces isomères peut être très intéressante pour contrôler cette voie de signalisation avec une grande résolution spatio-temporelle par photo-isomérisation.

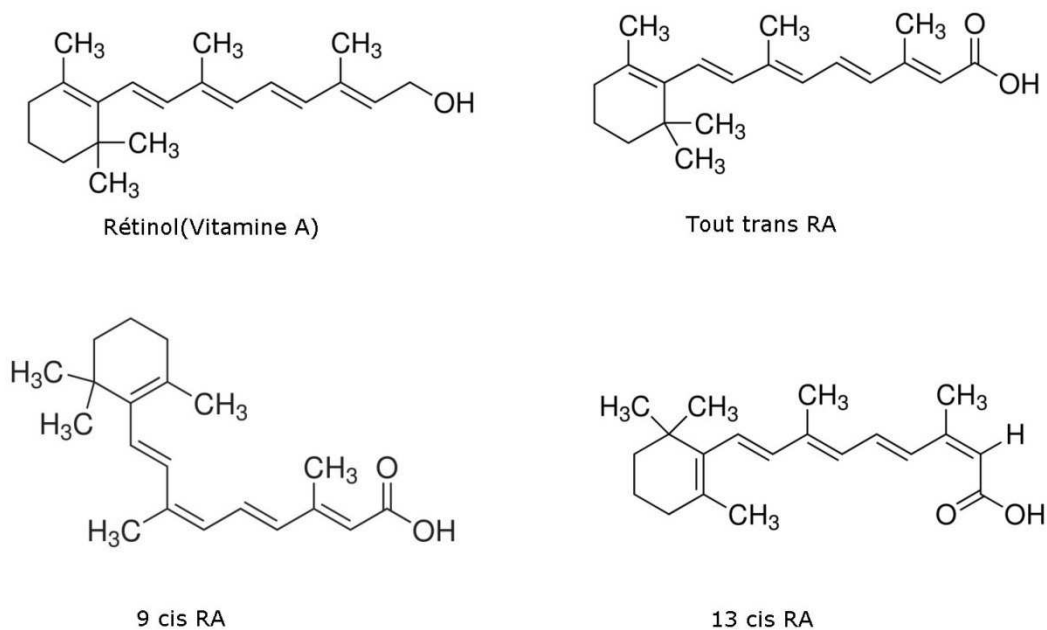


Figure 2.1. Structure de la vitamine A (tout trans rétinol) et ses principaux dérivés

## 2.1 Histoire de la découverte du rétinol

Les animaux sont incapables de produire le rétinol. Il est strictement obtenu par l'alimentation. C'est pour cela qu'il est classé parmi les vitamines essentielles et qu'il est appelé communément vitamine A. En Chine, dès la dynastie Tang (618-907), les médecins chinois traitaient la cécité nocturne, maladie caractérisée par une diminution anormale de la vision dans l'obscurité, par administration de foie de chèvre et de plantes riches en bêta-carotène. Mais à l'époque, les médecins ne savaient pas encore quel ingrédient dans le foie des animaux produit cet effet thérapeutique. Au 17<sup>ème</sup> siècle, des médecins occidentaux encourageaient également leurs patients à manger du foie pour traiter la cécité nocturne.

En 1913, Elmer.V. McCollum et Marguerite Davis mirent en évidence la présence de cette substance dans les corps gras alimentaires et dans l'huile de foie de poisson. Ils montrèrent aussi que la présence de cet élément favorise la croissance et le développement des rats. En revanche, l'absence de cette substance conduit à une perte de poids et à une malformation de la rétine. Ils montrèrent qu'en absence de cet élément, les animaux de laboratoire étaient atteints d'une infection oculaire. Ils baptisèrent cette substance liposoluble A. Ils notèrent par la suite que des carences en liposoluble A provoquaient une baisse, voire une altération complète de la vision nocturne. Cette molécule liposoluble porte le nom de rétinol à cause de son rôle important dans la vision

Le biochimiste américain George Wald découvrit le processus biochimique de la vision, où intervient une variété de dérivés de la vitamine A, ce qui permit d'expliquer la cause de la cécité nocturne. Il découvrit que la vitamine A est un des composants de la rhodopsine, un pigment de la rétine que l'on trouve dans les bâtonnets, il découvrit aussi un composé, proche de la vitamine A, de nos jours appelé rétinol, et propose qu'un cycle de réaction chimique existe. Pour Wald, la rhodopsine est formée d'une protéine, l'opsine, liée au rétinol. Le rétinol est relâché lors de l'absorption de lumière puis se transforme en vitamine A, qui se lie à l'opsine pour reformer de la rhodopsine ce qui termine le cycle. Le cycle de la vision est régi par la photoisomérisation du rétinol : lorsque le rétinol 11-*cis* absorbe un photon, il passe de l'état 11-*cis* à l'état tout-*trans* ; cette isomérisation est à l'origine d'un influx nerveux par phototransduction. La vitamine A étant plus stable que le rétinol, la carence en vitamine A va épuiser le stockage en rétinol, ce qui entraîne un dysfonctionnement des bâtonnets. Ces travaux furent couronnés par le prix Nobel de physiologie et médecine en 1967.

## 2.2 Source alimentaire et métabolisme du rétinol

Le rétinol provient de l'alimentation. Le foie, les huiles de poisson, les produits laitiers sont des sources animales de vitamine A. Dans les produits alimentaires d'origine animale, la vitamine A est présente sous la forme d'ester de rétinol. La vitamine A peut aussi être synthétisée par l'organisme à partir de caroténoïdes (en particulier le bêta-carotène) qui sont présents dans des produits végétaux jaune-orangés, notamment la carotte, l'abricot, l'épinard et le melon. Le bêta carotène peut être transformé en rétinol dans l'organisme par une caroténoïde monooxygénase, une molécule de bêta-carotène produisant 2 molécules de rétinol (Fig. 2.2).

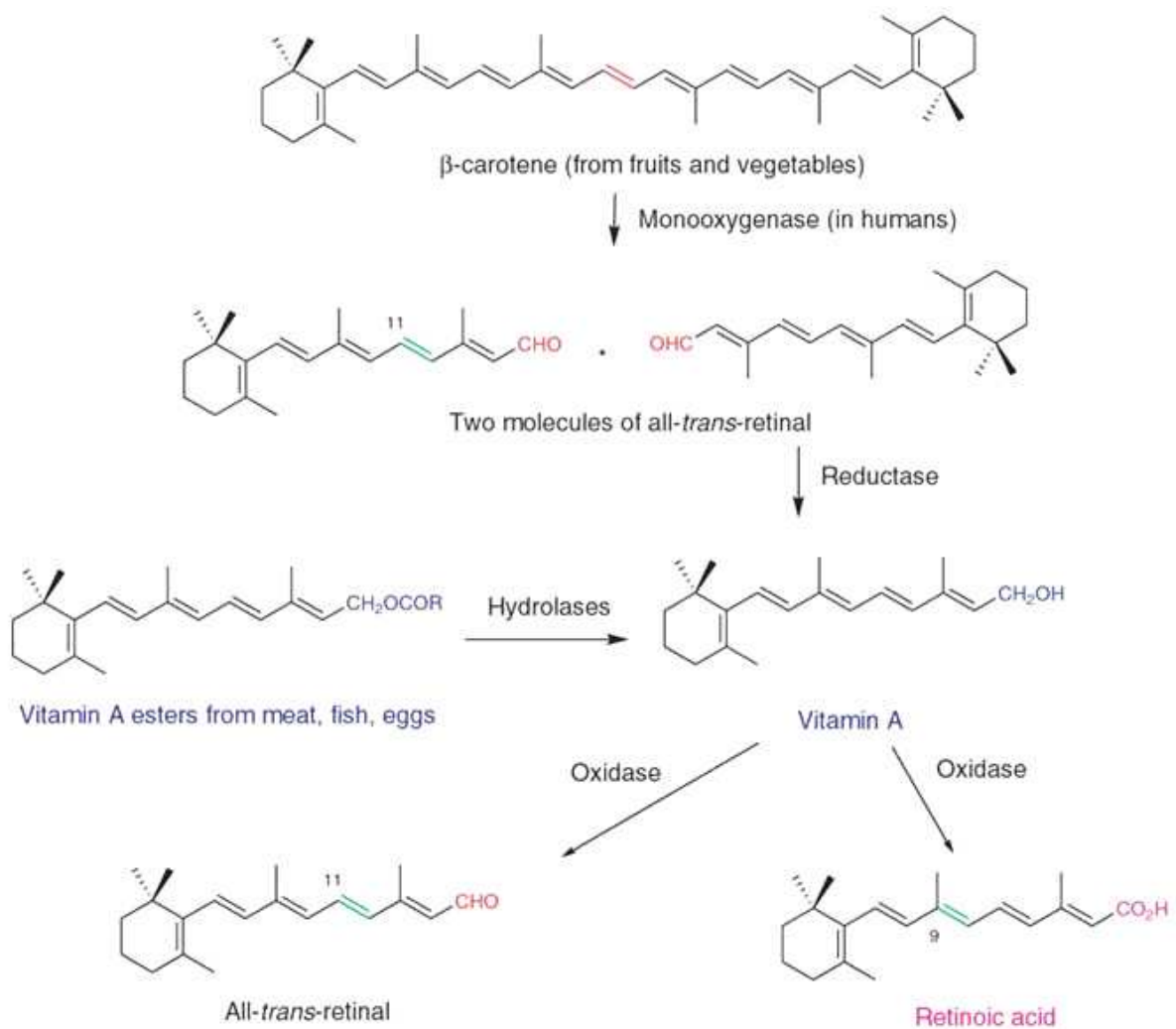


Figure 2.2. Source alimentaire de vitamine A. Elle est souvent sous forme estérifiée dans les produits animaux. Dans les produit végétaux, le clivage du bêta-carotène produit deux molécules de rétinol<sup>[17]</sup>.

### **Effets d'une carence en vitamine A**

Chez la souris, il a été démontré que la carence en vitamine A est associée à un retard de croissance, à une dégénérescence de la rétine, et à une neurodégénérescence de motoneurones<sup>[18][19][20]</sup>. Chez une femelle gestante, la carence en vitamine A peut entraîner des malformations chez l'embryon, notamment des malformations génito-urinaires, respiratoires et cardio-vasculaires. Chez l'homme, une carence en vitamine A entraîne des retards de croissance<sup>[21]</sup>. Elle entraîne également une cécité et une augmentation de la sensibilité aux infections liée à une défaillance du système immunitaire<sup>[22][23][24]</sup>.

### **Effets toxiques de l'ATRA**

La surconsommation de vitamine A sous forme d'ester de rétinol entraîne des symptômes de toxicité aigue : vomissements, diarrhées et céphalées. Chez le rat, à long terme, elle conduit à un retard de croissance et à une fragilisation des os<sup>[25][26]</sup>. Une surconsommation de vitamine A sous forme d'ester de rétinol est tératogène. Chez le rat femelle peut entraîner des malformations chez le fœtus comme des fentes palatines ou une diminution du nombre de doigts, ainsi que de sévères malformations du système nerveux central. L'embryon de poisson zèbre traité par l'ATRA rétinol exogène présente des malformations du rhombencéphale, du cœur, du pancréas ainsi que de beaucoup d'autres organes<sup>[27][28]</sup>

## 2.3 Digestion, transport et stockage

Dans l'organisme, le métabolisme du rétinol est complexe. Le rétinol et les bêta carotènes sont incorporés et absorbés dans les cellules épithéliales de l'intestin où les bêta carotènes sont oxydés en rétinaldéhydes (forme plus soluble) qui sont ensuite réduits en rétinol (Fig2.3). Le rétinol est ré-estérifié et incorporé aux chylomicrons (lipoprotéine). Ces derniers passent dans le système lymphatique puis dans la circulation générale<sup>[29]</sup>. Au cours de la circulation, quelques chylomicrons peuvent être captés directement par les tissus qui possèdent des récepteurs en surface de leurs cellules, permettant une action rapide des rétinoïdes<sup>[30]</sup>, mais la plupart sont transportés vers le foie qui constitue le principal organe de stockage et de métabolisme du rétinol<sup>[31]</sup>. Dans le foie, les cellules parenchymateuses sont responsables de la captation des chylomicrons, les esters de rétinol y sont hydrolysés en rétinol. Le rétinol va se lier à une protéine de transport spécifique, la RBP (retinol binding protein). Le rétinol est ensuite transporté dans les cellules stellaires du foie où il est stocké sous forme d'ester de rétinol. Pour être transporté dans d'autres cellules, le complexe rétinol-RBP s'associe à la transthyréline (TTR) dans la circulation sanguine. Des modalités diverses sont proposées quant à la manière dont les cellules cibles captent le rétinol<sup>[32]</sup>. Cette captation pourrait se faire grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques de la RBP, ou bien grâce à la propriété hydrophobe du rétinol qui permet son incorporation à la membrane lipidique et sa

diffusion vers les compartiments intracellulaires<sup>[33]</sup>.

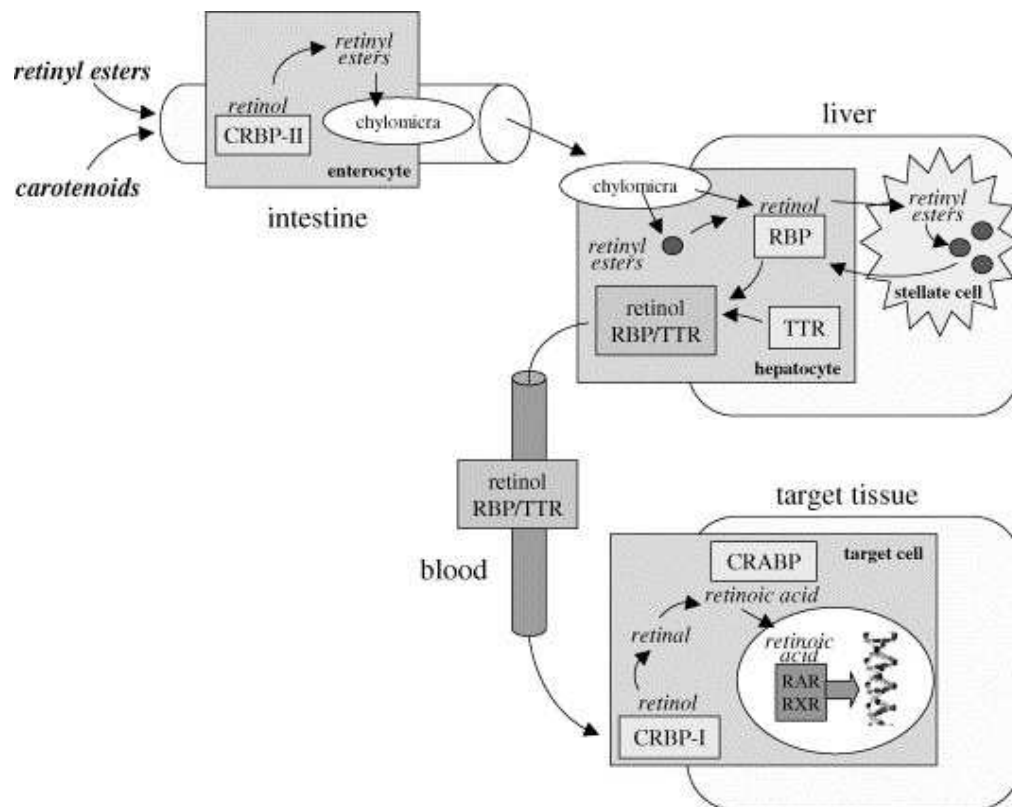


Figure 2.3. Absorption, transport et métabolisme des rétinoïdes<sup>[34]</sup>.

## 2.4 Métabolisme dans la cellule cible

Dans la cellule cible, il existe un métabolisme non oxydatif produisant des rétinyl esters, rétinyl-phosphates, 3-déhydro-rétinols ainsi qu'un métabolisme oxydatif donnant du rétinol puis de l'ATRA, métabolite le plus actif de rétinol (Fig. 2.4).

Le rétinol est liposoluble et insoluble dans l'eau. Par conséquent, dans le cytoplasme de la cellule cible, le rétinol doit se lier à des protéines de transport cellulaire de type CRBP (cellular retinol binding protein)<sup>[35]</sup>. Les CRBP vont ensuite livrer le rétinol à l'alcool déshydrogénase (ADH) qui transforme le rétinol en rétinaldéhyde. Cette réaction est réversible grâce à des déshydrogénases de rétinol (RDH). Le rétinol lié au CRBP peut aussi être catalysé



par la rétinol acyltransférase (LRAT) qui permet son stockage sous forme estérifiée. La réaction inverse qui permet de convertir l'ester de rétinol en rétinol est catalysée par des hydrolases d'ester de rétinol (REH)<sup>[36]</sup>.

Le rétinaldéhyde est ensuite converti de manière irréversible en acide rétinoïque par la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH). Une fois converti, l'ATRA est pris en charge par sa protéine de transport CRABP (cellular retinoic acid binding protein) et pénètre dans le noyau où il agit comme ligand des récepteurs nucléaires de l'ATRA, les RARs, qui lui sont spécifiques et vont médier son action sur la transcription des gènes cibles. Il peut aussi être dégradé en acide 4-oxo-rétinoïque par des cytochromes P450 hydroxydase (CYP26)<sup>[37]</sup>.

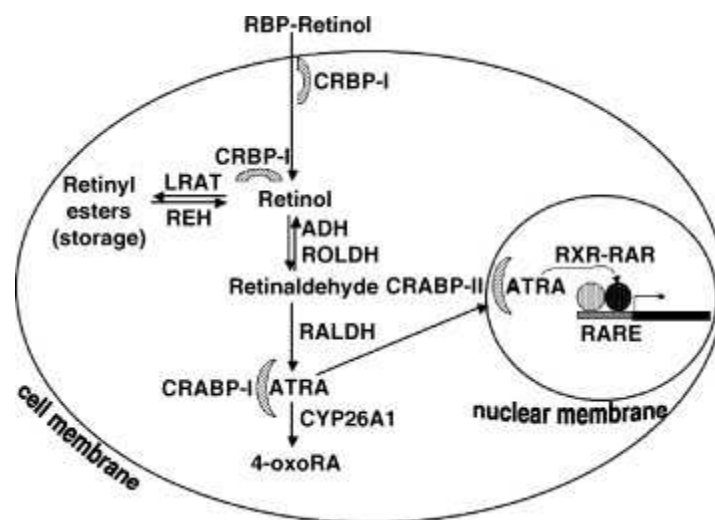


Figure 2.4. Métabolisme des rétinoïdes dans la cellule : de leur absorption jusqu'à l'activation de la transcription ou la dégradation. ADH: alcool deshydrogénase ; ATRA : acide rétinoïque tout trans ; CRBP : protéine de transport cellulaire du rétinol ; CRABP : protéine de transport cellulaire de l'ATRA ; CRALBP : protéine de transport cellulaire du rétinaldéhyde ; CYP26 : cytochrome P450 hydroxylase 26; LRAT: lécithine rétinol acyltransférase ; RALDH : rétinaldéhyde deshydrogénase ; RDH : rétinol deshydrogénase ; REH : rétinyl ester hydrolase<sup>[36]</sup>.

## 2.5 Source de l'ATRA au cours du développement embryonnaire

Dans l'embryon placentaire, le rétinol contenu dans le sang maternel est la source majeure de l'ATRA. Chez les espèces ovipares, le stockage de rétinol est dans le jaune d'oeuf. Par le transfert du placentaire ou vitellus, le rétinol est capté par la protéine RBP4 qui s'exprime dans l'endoderme viscéral à partir du stade de gastrulation (Fig. 2.5). Ce complexe RBP4-rétinol traverse la membrane cellulaire par le STRA6. Le gène *stra6* est sous contrôle de l'ATRA, son patron d'expression est complexe durant le développement. Cela donne un indice des tissus dans lequel le rétinol est préférentiellement livré<sup>[38]</sup>. Deux enzymes sont capables de convertir le rétinol en rétinaldéhyde, l'alcool déhydrogénase cytosolique (ADH7) et le rétinol déhydrogénase microsomale (RDH10). L'étude sur souris de perte de fonction suggère que le rétinol est catalysé en rétinaldéhyde principalement par ADH7 de manière ubiquitine. La mutation de ADH7 est partiellement létale après la naissance<sup>[39]</sup>. Par la suite, l'étude sur la mutation de RDH10 montre que la mutation de RDH10 est létale avant la naissance (E13.5 chez la souris). En effet, RDH10 établit un premier niveau de la régulation dans les tissus spécifiques tels que l'œil, le pancréas, l'intestin, la vésicule otique ainsi que les membres antérieurs. On observe que l'activité de l'ATRA persiste chez le mutant de RDH10, cela indique que d'autres enzymes telles que ADH7 sont capables de générer le rétinaldéhyde en faibles proportions<sup>[40]</sup>. Le rétinaldéhyde est ensuite oxydé en ATRA. Cette réaction est médiée par des rétinaldéhydes déhydrogénases (RALDHs). Il existe trois types de RALDH. Leur expression est spécifique selon le stade du développement et le tissu<sup>[41][42][43]</sup>. Par les

études sur les mutants de ces trois gènes, on observe que RALDH2 est le responsable de presque toute la production d'ATRA durant le développement précoce. La mutation de RALDH2 chez la souris entraîne des malformations sévères du télencéphale, rhombencéphale, du cœur, des somites et des membres antérieurs<sup>[44][45][46]</sup>. RALDH3 joue un rôle dans le développement tardif de l'œil et du nez<sup>[47]</sup> Le mutant de RALDH1 est viable, son rôle est aussi dans le développement de l'œil<sup>[47][48]</sup>.

Dans l'embryon des vertébrés primitifs et des poissons marins, la source de l'ATRA est principalement composée de caroténoïdes contenus dans le vitellus. Le clivage de bêta-carotène par la bêta-carotène oxygénase(BCO) génère directement le rétinaldéhyde qui va ensuite se transformer en l'ATRA par RALDH3<sup>[49]</sup>.

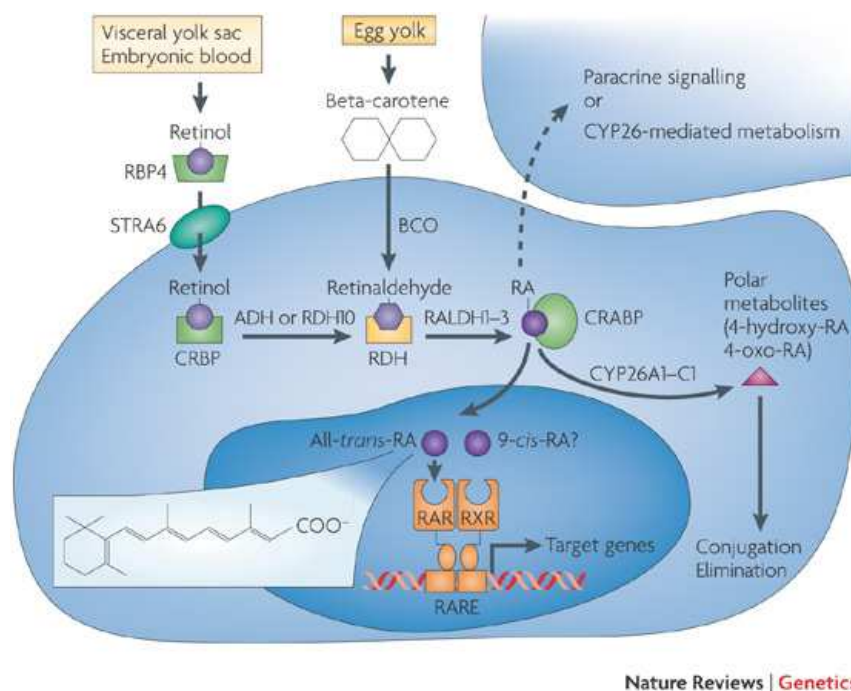


Figure 2.5. Régulation de la voie de l'ATRA dans une cellule embryonnaire<sup>53</sup>. Plusieurs protéines contrôlent la dynamique de la voie de l'ATRA. STRA6, RDH10, et les RALDHs,

CRABP ainsi que Cyp26 permettent de contrôler l'activité de la voie de l'ATRA dans les tissus spécifiques<sup>[50]</sup>.

## 2.6 Récepteur nucléaire de l'ATRA

Le RA contrôle l'expression de ses gènes cibles en se liant à deux types de récepteurs nucléaires : les récepteurs de l'ATRA (RARs) et les récepteurs des rétinoïdes (RXRs)<sup>[51]</sup>. Les récepteurs de l'ATRA forment deux familles multigéniques. La première famille comprend des récepteurs de type RAR (récepteurs de l'ATRA). La seconde comprend des récepteurs de type RXR (récepteurs des rétinoïdes). Il existe trois isotypes de RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) ainsi que trois isotypes de RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Chacun étant codé par un gène différent<sup>[52]</sup>. Chaque isotype de RAR (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) et RXR (RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) existe sous plusieurs isoformes: RAR $\alpha$ 1, RAR $\alpha$ 2, RAR $\beta$ 1 à  $\beta$ 4 et RAR $\gamma$ 1 et RAR $\gamma$ 2 pour les RARs et RXR $\alpha$ 1, RXR $\alpha$ 2, RXR $\beta$ 1, RXR $\beta$ 2 et RXR $\gamma$ 1 et RXR $\gamma$ 2 pour les RXR. Les isoformes de RARs proviennent de l'initiation de différents promoteurs ou sont obtenus par l'épissage alternatif du même ARN, contrairement aux isoformes de RXRs qui sont issus uniquement de l'initiation de différents promoteurs<sup>[53][54]</sup>.

## 2.7 Récepteur nucléaire des RARs et RXRs

Les RAR et RXR présentent une structure modulaire bien définie, commune à la plupart des récepteurs nucléaires. Ils sont organisés en 6 domaines noté de A à F (Fig. 2.6A). Certains domaines possèdent des fonctions importantes telles que la dimérisation, la transactivation et la fixation du ligand.

- **Le domaine A/B** : correspond à l'extrémité NH<sub>2</sub> du récepteur. Ce domaine module est impliqué dans la transactivation de manière indépendante du ligand par le domaine de transactivation AF1 (Activation Function 1). En l'absence de ligand, ce domaine est capable d'activer la transcription des gènes cibles<sup>[55]</sup>. La région est plus variable entre les différents sous types et isomères des RAR et RXR. Par contre, au sein des RAR, la région B est conservée et contient des sites de phosphorylation<sup>[55]</sup>.

- **Le domaine C** : C'est un domaine très conservé qui contient le domaine de liaison à l'ADN. Il est structuré en deux doigts de zinc permettant au récepteur de reconnaître des séquences spécifiques à l'élément de réponse situé dans le promoteur des gènes cibles<sup>[55]</sup>.

- **Le domaine D** : C'est un domaine peu conservé qui agit comme une charnière flexible entre les domaines C et E. Il permet un changement de configuration fonctionnelle après fixation du ligand et peut contenir une séquence de localisation nucléaire (NLS). Dans le cas de RXR, ce domaine est aussi impliqué dans la liaison à l'ADN.<sup>[56][57]</sup>

- **Le domaine E** : est situé du côté C terminal du récepteur. Ce domaine, très conservé entre différentes espèces, contient un site de liaison au ligand (Ligand Binding Domain : LBD) et un site de transactivation AF2 (activation function 2). La régulation de la transcription par AF2 dépend du ligand.<sup>[55]</sup> Ce domaine est actif à condition que le ligand soit lié au récepteur. Le domaine AF-2 est la cible de nombreux coactivateurs et corepresseurs<sup>[58][59][59]</sup>. La région E contient également une interface de dimérisation des

récepteurs nucléaires <sup>[52][60][61]</sup>. Dans certains cas, cette région contient un signal de localisation nucléaire <sup>[62]</sup>. La partie centrale du domaine E riche en leucine sert à la dimérisation du récepteur. Dans le cas des récepteurs RXR et RAR, ce domaine contient aussi des sites de phosphorylation par PKA <sup>[63]</sup>.

- **Le domaine F**: est un domaine peu conservé qui se situe du côté C-ter chez les RAR et absent de RXR. Il a été montré que la présence de cette région est indispensable à l'activation du domaine AF2 <sup>[64]</sup>, mais son rôle n'est pas encore bien élucidé. Les RAR et RXR se fixent sur des séquences spécifiques situées dans la partie régulatrice du gène qu'on l'appelle des éléments de réponse de l'ATRA (RARE) (Fig2.6). L'élément de réponse du RAR est composé de 2 motifs hexanucléotidiques : 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3' orientés en palindrome, répétition directe (DR) ou inversée (IR) (Fig. 2.6 B). Le plus fréquent est la répétition directe. Les 2 sites sont séparés par un nombre variable de nucléotides (N=1,2 ou 5), noté DR1, DR2 ou DR5 <sup>[65][66]</sup> (Fig. 2.6 C). Les RAR et RXR régulent la transcription du gène cible en se fixant sur l'ADN sous forme de dimère, un récepteur sur chaque séquence hexanucléotidique. Ils peuvent agir sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère (Fig2.6 D).

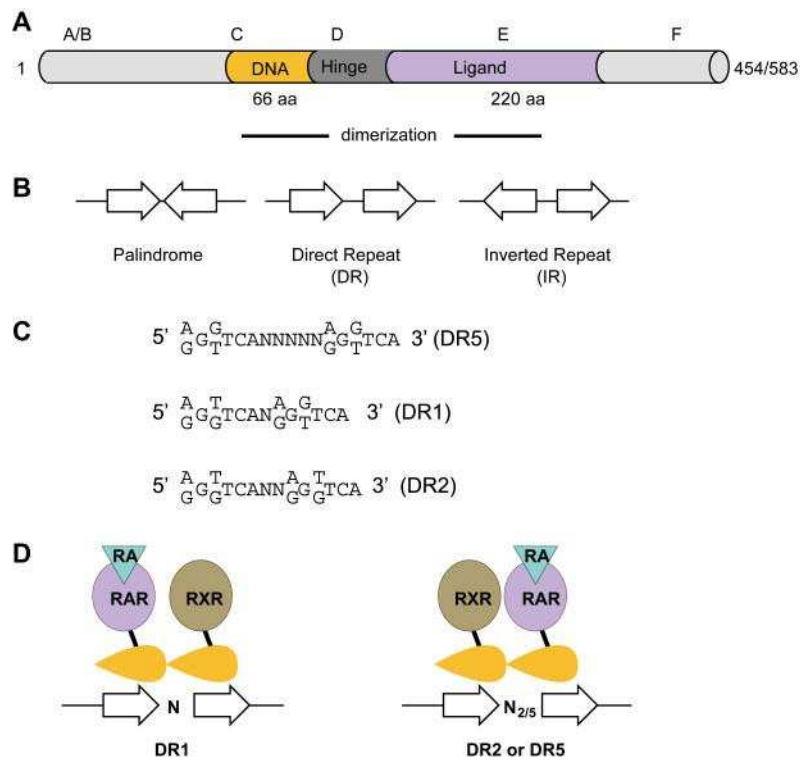


Figure 2.6. A : Structure générale du récepteur nucléaire. B : 3 types d'orientation possible dans un élément de réponse. C : Eléments de réponse avec exemple de répétition directe. Les deux séquences sont séparées par un nombre de nucléotides variant de N=0 à 5. D : Exemple de liaison des récepteurs des rétinoïdes sur des demi-sites en répétition directe avec l'hétérodimère RXR/RAR<sup>[67]</sup>.

## 2.8 Dimérisation de RAR et RXR

In vitro, l'homodimère de RAR peut se lier à des séquences spécifiques de l'ADN (promoteur P2 de RAR $\beta$ 2, DR5). Mais cette fixation n'est efficace que par l'intervention de facteurs externes. Les premiers facteurs à avoir été mis en évidence sont les RXRs<sup>[60]</sup>. Ainsi, l'hétérodimère RAR/RXR permet d'activer la transcription des gènes cibles. In vitro, la comparaison des homodimères RAR/RAR par rapport aux hétérodimères RAR/RXR a permis

de montrer que l'hétérodimérisation permet d'augmenter l'efficacité mais aussi la sélectivité de la liaison aux différents éléments de réponse <sup>[68]</sup>.

Les RXRs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation. Ils peuvent agir sous forme d'homodimères mais ils s'hétérodimérisent le plus souvent avec d'autres récepteurs nucléaires comme les RAR (récepteur de l'ATRA), COUP-TF (facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet), FXR (récepteur des farnésoïdes), LXR (récepteur X du foie), NGF1B (facteur de croissance neuronale 1B), PPAR (récepteur des péroxisomes en prolifération), TR (récepteur des hormones thyroïdiennes), ou VDR (récepteur de la vitamine D3) (pour revue, <sup>[52][69]</sup>) Certains hétérodimères impliquant RXR peuvent activer la transcription des gènes par la simple liaison du ligand sur RXR. C'est le cas des hétérodimères RXR/FXR, RXR/LXR ou RXR/PPAR <sup>[70]</sup>. Cependant, dans d'autres cas d'hétérodimérisation impliquant les RXRs (RXR/RAR, RXR/TR, RXR/VDR), la transcription des gènes n'est pas activée par la liaison du ligand sur RXR <sup>[71]</sup>. La régulation de la transcription est plus complexe et implique que chaque partenaire ait lié son ligand. Par exemple, l'hétérodimère RAR/RXR est transcriptionnellement actif seulement si les deux partenaires du dimère ont fixé leur ligand respectif <sup>[72]</sup>.



## Chapitre 3 Rôle de l'ATRA dans le développement du rhombencéphale

L'activité de l'ATRA est intensivement étudiée dans le développement et la segmentation du rhombencéphale. Ceci est partiellement dû à la découverte de l'expression combinatoire le long de l'axe rostro-caudal du rhombencéphale des gènes *hox* eux-mêmes régulés par l'ATRA <sup>[73][74][75]</sup>. L'excès ou l'insuffisance d'acide rétinoïque a pour résultat des effets tératogènes majeurs sur le développement embryonnaire et en particulier du rhombencéphale ce qui suggère que l'ATRA joue un rôle important dans la formation de cet organe <sup>[76][77][78]</sup>. L'action de l'ATRA est très dynamique dans le territoire du rhombencéphale. Son activité est finement régulée par sa synthèse, sa dégradation et son transport. Les études sur le rôle de RA dans l'expression des gènes *hox* et d'autres gènes qui contrôlent la segmentation du rhombencéphale supportent l'hypothèse de l'existence d'un gradient de RA selon l'axe antéro-postérieur.

Dans ce chapitre, je présenterais l'effet de l'ATRA sur la formation du rhombencéphale ainsi que ses effets tératogènes. Ensuite, je décrirais le mécanisme qui pourrait permettre la formation d'un gradient d'acide rétinoïque. Je discuterais également des modèles actuels qui décrivent son action dans le développement du rhombencéphale ainsi que des limitations techniques pour valider ces modèles.

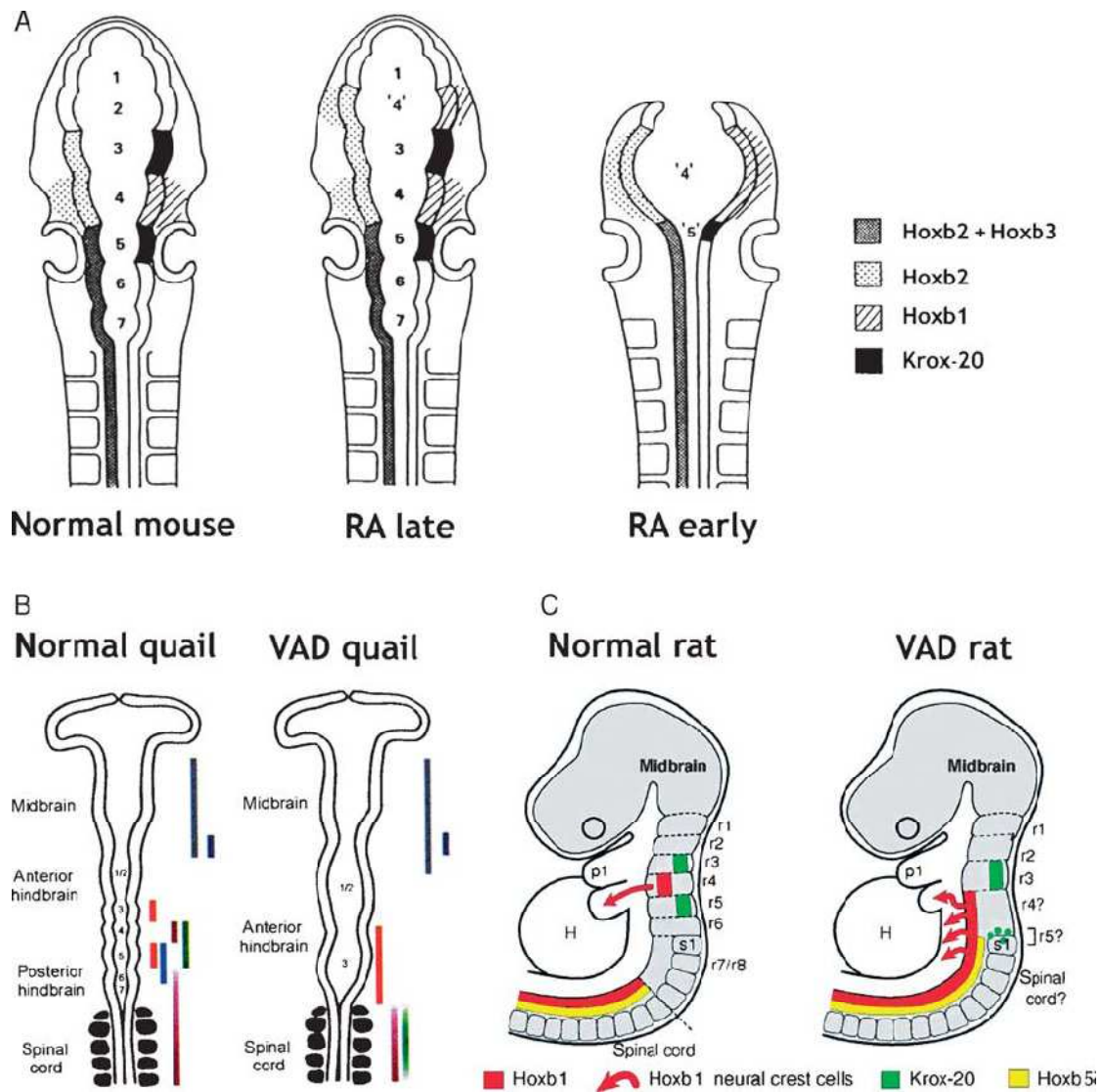


Fig3. L'effet tératogène des rétinoïdes dans le développement du rhombencéphale entraîné par excès ou déficit de RA. A : L'effet tératogène dépend du stade de développement chez la souris. L'excès de RA entraîne une malformation morphogénétique sévère durant le développement aussi bien précoce que tardif [79]. B : Le déficit de RA chez l'embryon de caille entraîne lui aussi des défauts morphogénétiques majeurs : les marqueurs postérieurs sont remplacés par des marqueurs antérieurs du rhombencéphale [80]. C : Effet du déficit de RA chez l'embryon de rat [81].

### 3.1 L'effet d'excès ou déficit de RA sur le développement du rhombencéphale

L'effet tératogène de l'ATRA sur le développement du rhombencéphale a été observé il y a 40 ans par Gillian Morriss-Kay <sup>[76]</sup> (Fig3.1 A). Elle a montré que l'excès d'acide rétinoïque dans l'alimentation de femelles en gestation peu avant ou durant le stade de la neurulation entraîne un raccourcissement du rhombencéphale<sup>[76]</sup>. Par la suite, des études sur les souris <sup>[82][83]</sup> ont montré que l'effet tératogène est fortement dépendant du stade de développement. Il varie entre une disparition du rhombencéphale présomptif si l'exposition à RA est juste avant la somitogénèse et une morphologie quasiment normale ou avec une plus forte expression des gènes postérieurs dans la partie antérieure si l'exposition à RA suit le début de la somitogénèse. Des effets similaires ont été observés chez le Xénope <sup>[77][84]</sup> et le poisson zèbre <sup>[78]</sup>. Cependant, d'après les études sur l'analyse d'expression des gènes antérieurs du rhombencéphale sur la migration et la différenciation de la crête neurale<sup>[79][83]</sup>, les auteurs ont conclu que l'effet tératogène d'un excès d'acide rétinoïque sur le rhombencéphale est dû à une disparition de sa segmentation et une transformation des neurones en d'autres types cellulaires plutôt qu'à la perte du territoire du rhombencéphale. Le patron d'expression des gènes de segmentation et des gènes *hox* tel que le *krox 20*, *hoxb1* et *hoxb2* sont déplacés vers un phénotype de segmentation plus postérieur. Dans le cas extrême, la région normalement occupée par les rhombomères 1-4 (r1-r4) est transformée en une seule partie de tube neural avec un patron d'expression de r4 (Fig A). Par ailleurs, l'isomère 9-cis RA semble exhiber un effet tératogène plus prononcé <sup>[85][86]</sup>.

Ces études montrent que durant le développement du tube neural, l'excès d'acide rétinoïque dans une fenêtre de temps spécifique perturbe fortement le patron d'expression de la partie antérieure du rhombencéphale. Cependant la partie postérieure reste néanmoins non affectée. Et cela bien qu'une disparition de la segmentation du rhombencéphale postérieur chez l'embryon de poulet ait été observée après une exposition locale à RA à un stade tardif après que la somitogénèse ait commencé<sup>[87]</sup>.

Un déficit en RA présente aussi des effets tératogènes. Ces effets ont été étudiés dans l'embryon de caille déficient en vitamine A (VAD)<sup>[80]</sup>. (Fig 3.1 B) Dans ces embryons, le patron d'expression génétique du rhombencéphale antérieur semble normale, mais les gènes caractéristiques de la région postérieure ne sont plus exprimés. En conséquence, les cellules destinées à développer les rhombomères postérieurs r4-r7 contribuent au rhombomère r3 dont le domaine s'étend jusqu'au premier somite. Chez le rat, la partie antérieure du rhombencéphale semble normale<sup>[81]</sup>, sa partie caudale est plus courte et le patron d'expression est anormal : les rhombomères r5-r8 sont transformés en r4 (Fig 3.1 B).

### **3.2 Le gradient de l'ATRA**

L'effet tératogène d'excès ou de déficit d'acide rétinoïque suggère que RA agit comme un signal endogène important à l'établissement de l'axe antéro-postérieur. L'excès en RA affecte le développement du rhombencéphale antérieur tandis que son déficit affecte le rhombencéphale postérieur. Ceci suggère que le niveau endogène de RA est plus élevé dans la partie postérieure et plus faible dans la partie antérieure, autrement dit, qu'un gradient rostro-caudal d'acide rétinoïque pourrait exister. Cependant, cette hypothèse est difficile à

vérifier car l'ATRA est une petite molécule liposoluble difficile à détecter de manière directe. Grâce à un ligné de poisson zèbre transgénique contenant 3 copies d'une séquence RARE induisant l'expression d'une protéine fluorescente YFP, Perz-Edwards et al. ont observé un signal fluorescent légèrement plus fort dans la partie postérieure que la partie antérieure<sup>[88]</sup>. Les études sur souris transgéniques portant un gène LacZ sous contrôle d'une séquence RARE ont montré qu'au stade E8.25-9.25, l'activité RA est détectable dans le rhombencéphale postérieur jusqu'au rhombomère r5. A un stade plus précoce, l'activité RA peut être détectée jusqu'à la frontière entre r2 et r3. Bien que ces études permettent de visualiser le gradient de manière indirecte, cela n'est pas suffisant pour déterminer la nature du gradient. Deux hypothèses ont été émises:

1) L'ATRA est exprimé localement dans la partie postérieure du rhombencéphale et diffuse vers la partie antérieure.

2) L'expression RA est homogène le long de l'axe antéropostérieur, mais les récepteurs de RA sont localisés plus vers la partie postérieure.

Pour tester ces hypothèses, Colbert et al. ont transféré un ligné de cellules reportrices contenant une construction *RARE : lacZ* co-cultivée dans la région du tube neural de souris afin de localiser la source d'acide rétinoïque<sup>[89]</sup>. Le résultat indique que l'activité RA provient uniquement du tube neural. Des résultats similaires sont observés chez le xénope<sup>[90]</sup>, et la souris<sup>[91]</sup>. McCaffery et Drager ont aussi utilisé la zymographie (méthode d'électrophorèse utilisée pour détecter l'activité d'une enzyme) afin de déterminer la distribution spatiale de la synthèse de RA<sup>[91]</sup>. En conclusion, ces études de co-culture de cellules et de zymographie montrent que la synthèse de RA et son activité présentent le même profil antéropostérieur.

### 3.3 Synthèse de l'ATRA dans le rhombencéphale

Le site de production de l'ATRA chez le poulet et la souris a été déterminé à travers l'expression de son enzyme de synthèse, la rétinaldéhyde déhydrogénase (RALDH2) <sup>[92][93]</sup>. La RALDH2 génère l'ATRA par oxidation du rétinaldéhyde. Les études d'immuno-histochimie et d'hybridation *in situ* ont montré que chez le poisson zèbre <sup>[94]</sup> comme chez la souris <sup>[95]</sup>, cet enzyme est exprimée durant le développement précoce dans le mésoderme paraxial jusqu'à la première somite adjacente du rhombencéphale postérieur. Les études sur souris mutante (RALDH2 -/-) montrent l'existence d'une malformation du rhombencéphale qui ressemble aux observations chez la caille VAD : la taille du rhombomère postérieur est réduite et l'expression des gènes postérieurs est remplacée par des gènes antérieurs <sup>[96]</sup>. De manière similaire, chez le poisson zèbre connu sous le nom de mutant *neckless* (possédant une mutation de perte de fonction de RALDH2), la taille du rhombencéphale postérieur est réduite entre r5 et la première somite, tant dis que la partie antérieure reste inchangée <sup>[97]</sup>. En revanche, la surexpression de RALDH2 chez le xénope entraîne une postériorisation du rhombencéphale. Ces études montrent que l'ATRA synthétisé par RALDH2 est localisé dans la moelle épinière puis diffuse antérieurement jusqu'au rhombencéphale pour définir le rhombencéphale postérieur. Ces résultats sont consistants avec un modèle de gradient dans lequel la concentration de l'ATRA est plus forte dans la partie postérieure que dans la partie antérieure du rhombencéphale. En effet, selon ce modèle, la nature de ces régions est définie par la concentration de l'ATRA qui régule la transcription de gènes tel que les gènes *Hox* (dont l'expression nécessite une concentration en RA d'autant

plus forte qu'ils sont plus postérieurs). Cependant, l'existence d'une famille d'enzymes qui métabolise l'ATRA dans le rhombencéphale rostral peut aussi permettre la formation de ce gradient.

### **3.4 Dégradation de l'ATRA dans le rhombencéphale**

L'ATRA est catabolisé par des enzymes (CYP26) de la famille P450 de la cytochrome oxidase<sup>[98][99][100]</sup>. Ils convertissent l'ATRA d'abord en 4-hydroxy-RA puis par une réaction d'oxydation, ce dernier est converti en 4-oxo-RA. Par des méthodes biochimiques et à l'aide de cellules rapportrices, Yamamoto et al. ont montré que l'activité catabolique de l'ATRA due à une enzyme du cytochrome oxidase p450 est particulièrement importante dans le rhombencéphale de l'embryon de souris. Par la suite, la première enzyme CYP26 a été identifiée chez la souris et le xénope<sup>[100][101][102]</sup> et son expression est localisée dans le rhombencéphale antérieur. Chez le poulet, son expression est limitée au prosencéphale et mésencéphale. Ainsi, chez les trois espèces, la localisation des enzymes RALDH2 (responsable de la synthèse de RA) et CYP26 (responsable de sa dégradation) implique une source postérieure et une dégradation antérieure de l'ATRA qui sont consistantes avec la notion d'un gradient antéro-postérieur. Par la suite, d'autres membres de la famille CYP26 ont été identifiés et clonés et leur patron d'expression a été étudié par hybridation *in situ*. Quatre membres de cette famille ont été identifiés : CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1 et CYP26D1. CYP26A1 a été identifié chez le poisson zèbre, la souris, le xénope et le poulet. CYP26B1 et CYP26C1 sont présents chez le poisson zèbre, le poulet et la souris. CYP26D1 est trouvé uniquement chez le poisson zèbre. Tous les quatre sont exprimés dans le

rhombencéphale de chaque espèce et leur patron d'expression est relativement conservé. On trouve une forte expression de *cyp26A1* dans les rhombomères r2 et r4. La perte de fonction de CYP26A1 chez la souris et le xénope et la mutation de cette enzyme chez le poisson zèbre entraînent une expansion du domaine d'expression des gènes de la partie postérieure du rhombencéphale et sa partie antérieure est mal spécifiée<sup>[103][104][105][106]</sup>, ces effets sont similaires à ceux dus à un excès d'acide rétinoïque. En revanche, la surexpression de CYP26 chez le xénope restaure l'effet tératogène dû à un déficit d'acide rétinoïque. L'expression ectopique de CYP26 dans le xénope entraîne une antériorisation du rhombencéphale similaire à l'effet dû à une déficience en acide rétinoïque. Chez le poisson zèbre, la surexpression de CYP26A1 inhibe l'expression des gènes postérieurs mais il n'induit pas l'expression des gènes antérieurs dans la région postérieure du rhombencephale<sup>[101][105]</sup>. Ces effets sont gradués: une augmentation progressive de l'expression de CYP26 entraîne une antériorisation progressive des rhombomères individuels<sup>[101]</sup>.

### **3.5 L'expression dynamique du Cyp26s**

Le signal de l'ATRA s'étend et recule dans le rhombencéphale durant le développement, probablement à cause de l'expression dynamique de CYP26s. *Cyp26a1* est le premier gène de cette famille qui s'exprime et son expression est limitée à la plaque neuronale antérieure au début et durant la gastrulation<sup>[105]</sup>. Son expression se déplace plus postérieurement jusqu'à la frontière de r3 et r4 puis se limite à r3 chez le poisson zèbre et à la frontière r2 et r3 chez la souris<sup>[105][107][108]</sup>. Cependant, White et al ont montré chez le poisson zèbre que *cyp26a1* est



aussi faiblement exprimé par les cellules dans la région du rhombencéphale de r3 jusqu'à r7. Cette faible expression semble induite par l'ATRA lui-même <sup>[109]</sup>.

L'expression de Cyp26b1 apparaît plus tardivement et plus dynamiquement dans le cerveau postérieur, son expression est indépendante de l'ATRA <sup>[109]</sup>. Chez le poisson zèbre, il s'exprime d'abord dans r3/r4 et r2-r6 au début de la somitogénèse <sup>[110]</sup>. Chez le poulet, son expression est initiée dans r4 puis étendue jusqu'au r1-r6 <sup>[111]</sup>. Chez la souris, il s'exprime initialement dans r3 et r5 puis dans r2-r6 <sup>[112]</sup>. La preuve directe que cyp26b1 contribue au développement du cerveau postérieur provient d'études chez le poisson zèbre. L'injection de morpholinos qui inhibent la production des protéines Cyp26b1 ne cause pas de défauts morphologiques du cerveau postérieur. Cependant lorsqu'ils sont injectés dans des mutants de cyp26a1, ils causent l'expansion du rhombomère r4 et de la frontière r6/r7 qui est déplacée antérieurement <sup>[108]</sup>.

Cyp26c1 est également exprimé dans le cerveau postérieur et son patron d'expression varie considérablement entre les espèces. Chez le poisson zèbre, son expression commence au stade blastula où elle est limitée aux rhombomères r2-r4 puis elle s'étend aux rhombomères r2-r6 <sup>[108]</sup> et au cerveau postérieur dorsal. Chez le poulet, son expression commence durant la gastrulation dans le mésoderme antérieur, puis dans les rhombomères r2/r3 et s'étend vers r4-r6 <sup>[113]</sup>. Chez la souris, L'expression de Cyp26c1 apparaît d'abord au stade E7.5 dans les cellules mésenchymeuse de la tête <sup>[114]</sup> et après la gastrulation dans r2 et r4 <sup>[115]</sup>.

L'expression dynamique de RALDH2 et des CYP26 dans le territoire du rhombencéphale est contrôlé par l'ATRA. RALDH2 est inhibé par RA alors que CYP26a1 est induit par RA. L'expression de cyp26 a1 est aussi dépendant des voies FGF et Wnt <sup>[105]</sup> qui

pourraient jouer un rôle dans la définition du domaine d'activité enzymatique dans le rhombencéphale.

### **3.6 Transport et stockage de RA par les CRABPs**

Contrairement aux autres morphogènes protéiques, l'ATRA a besoin d'être lié à des protéines de transport pour se solubiliser dans le cytoplasme. La concentration d'acide rétinoïque dans le rhombencéphale pourrait dépendre aussi de ces protéines de transport. Chez les vertébrés, la famille de transporteurs de l'ATRA contient deux membres, CRABPI et CRABPII. Ces protéines lient l'ATRA avec une haute affinité, mais pas le rétinol ou le rétinol<sup>116]</sup>. On leur a attribué divers rôles potentiels, y compris le stockage, l'atténuation de la voie de signalisation ainsi que la protection contre la dégradation enzymatique. Les CRABPs facilitent l'interaction entre l'ATRA et les RARs<sup>[117][118][119]</sup>, ils peuvent aussi protéger les cellules contre l'excès d'acide rétinoïque<sup>[120][121][122][36]</sup>. Plusieurs groupes ont montré que l'expression de CRABPI dans des modèles cellulaires sensibles à l'ATRA rendait les cellules insensibles à ses effets. Cette protéine serait donc un régulateur négatif de la signalisation par l'ATRA en maintenant l'ATRA dans le cytosol et en empêchant son association avec les RARs<sup>[123][124][124][124][125][121]</sup>. Il a été proposé par plusieurs auteurs, notamment par J.L. Napoli que CRABPI pourrait être impliquée dans le catabolisme de l'ATRA en facilitant sa dégradation par les Cyp26s.<sup>[126][127][128]</sup> Il a par ailleurs été montré dans des modèles cellulaires du tératocarcinome que plus le niveau de CRABPI exprimé est élevé, plus le taux de catabolisation de l'ATRA augmente, ce qui pourrait expliquer l'effet négatif de CRABPI sur la signalisation de l'ATRA<sup>[121]</sup>. Son rôle est de protéger les cellules contre l'excès d'acide rétinoïque en le séquestrant dans le cytosol, loin de leur récepteurs en facilitant leur dégradation par Cyp26<sup>[121][126][127][128]</sup>. En revanche, CRABPII semble avoir un rôle positif dans la signalisation par l'ATRA. L'expression de CRABPII dans la lignée cellulaire COS-7

augmente la transactivation d'un gène rapporteur de l'ATRA. Le mécanisme mis en jeu implique une interaction directe entre les récepteurs RAR et CRABPII. Il semble que CRABPII soit un coactivateur transcriptionnel des dimères de récepteurs RAR-RXR<sup>[129]</sup>. Cette protéine a une localisation cytosolique en absence d'acide rétinoïque, mais sa liaison à RA induit un changement de conformation qui expose un signal de localisation nucléaire. La protéine est donc transportée dans le noyau quand elle est associée à l'ATRA<sup>[130]</sup>. Son rôle serait donc de transporter l'ATRA du cytosol jusqu'aux récepteurs de l'ATRA dans le noyau, avec lesquels elle interagit physiquement<sup>[118][65]</sup>. Cependant la délétion génétique de CRABPI, de CRABPII ou celle combinée de CRABPI et CRABPII n'a pas d'effet visible chez la souris pendant le développement embryonnaire ou à l'âge adulte, ce qui pose la question de leurs rôles physiologiques respectifs<sup>[131]</sup>.

### **3.7 Problématique : quelle est la nature du gradient ?**

Le territoire d'expression de RALDH2 et CYP26 est compatible avec un gradient spatial de l'ATRA dans le rhombencéphale dont la concentration est plus forte dans la partie postérieure qu'antérieure. Cela conduit à proposer un modèle dans lequel RA forme un gradient linéaire qui agit tel un morphogène pour la spécification du rhombencéphale<sup>[93][132]</sup>. Par la suite, les études sur les souris mutantes de *Raldh2*<sup>-/-</sup> ont montré que la malformation du rhombencéphale peut être partiellement sauvée par une administration maternelle de RA<sup>[96]</sup>. Des études similaires réalisées sur le poisson zèbre traité par un inhibiteur de *Raldh2* et incubé dans un milieu enrichi en RA montre que la malformation du rhombencéphale est sauvée<sup>[133]</sup>. Les études sur le poisson zèbre permettent de proposer différents modèles (Fig3.2 A).

Hernandez *et al.* <sup>[108]</sup> proposent un modèle sans gradient dans lequel l'activité de RA dans la partie antérieure est limitée par l'expression des CYP26s. (Fig 3.2 B)

Maves et Kimmel<sup>[134]</sup> proposent que non seulement la concentration de RA est importante, mais le temps d'exposition à RA est aussi important pour l'induire l'expression du gène cible. Ils ont évalué la fenêtre d'exposition à RA sur le développement du rhombencéphale et ont montré que les gènes cibles de RA ne sont nécessaires qu'au début de leur expression. Si cette fenêtre est dépassée, les gènes cibles de RA ne peuvent plus être induits. Mais l'application de RA exogène à l'aide des billes pré-absorbées en RA peut induire l'expression des gènes plus tôt que leur fenêtre d'expression normale. Ces résultats suggèrent que le gradient de RA est interprété par un temps d'exposition à RA: la concentration de RA augmente au fil du temps, une fois qu'un certain seuil est atteint, les gènes cibles sont exprimés. Les gènes cibles de RA dans la partie postérieure du rhombencéphale sont exposés à des concentrations élevées de RA plus longtemps que ceux qui sont dans la partie antérieure <sup>[134]</sup> (Fig 3.2 C).

Par l'implantation de billes pré-absorbées dans RA, White et al proposent un modèle qui implique à la fois Cyp26a1 et un gradient antéro-postérieur de facteur de croissance de fibroblastes FGF (fibroblast growth factor). Dans ce modèle, durant la gastrulation, le gradient de RA est modulé par sa dégradation par Cyp26a1 qui est inhibé par RA et FGFs respectivement. Par ce mécanisme, RA est dégradé dans la partie antérieure du rhombencéphale par CYP26a1 et plus concentré dans la partie postérieure grâce à la présence concomitante de FGF <sup>[109]</sup> (Fig 3.2 D).

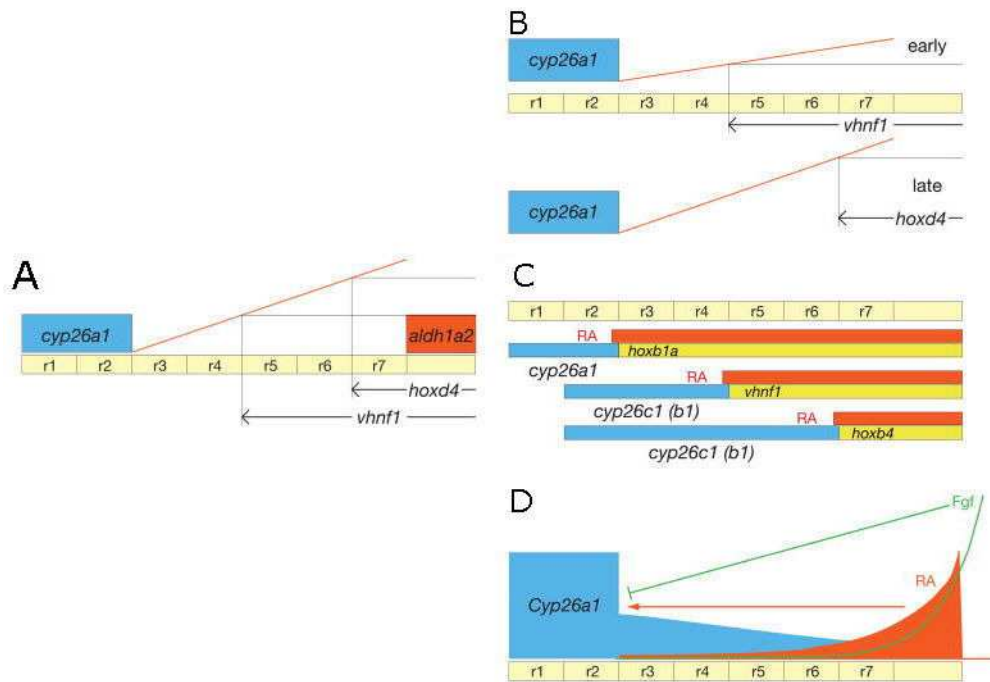


Figure 3.2. Modèles de la voie de régulation par RA et du développement du rhombencéphale. A: Le modèle classique dans lequel la concentration de RA est statique et linéaire, définie par une balance entre synthèse et dégradation. B: Modèle du gradient croissant. Dans ce modèle, la concentration de RA augmente avec le temps jusqu'à un certain seuil nécessaire pour initier l'expression des gènes cibles. C: modèle sans gradient: la concentration de RA est limitée par la présence de cyp26 dans les parties antérieures du rhombencéphale, et dont la frontière d'activité se déplace antérieurement lors du développement. D: modèle classique modifié. Dans ce modèle, le gradient de RA est limité par l'activité cyp26a1. Ce dernier est lui-même induit par RA dans la partie antérieure et inhibé dans la partie postérieure du rhombencéphale par Fgf (modifié de <sup>[109]</sup>) Dans ces différents modèles, la présence de RA est très dynamique. Pour mieux comprendre la dynamique de la voie RA, il faut développer un outil qui permette d'activer cette voie à un endroit et un stade de développement précis avec un temps d'exposition et une concentration

connue. Dans les études actuelles sur la voie RA, cette précision spatio-temporelle n'est pas atteinte. Pour activer la voie RA à un endroit précis, la méthode la plus commune utilise des billes pré-incubées dans une forte concentration de RA ( $10\mu\text{M}$ - $10\text{mM}$ )<sup>[109][134]</sup>, ce qui ne permet pas de contrôler la concentration (ou le gradient) de RA issu de cette implantation. Il est donc crucial de développer un outil permettant de contrôler l'activité de RA avec une résolution spatio-temporelle adéquate (quelques cellules et l'ordre de la minute) et avec une concentration connue.

## **Chapitre 4 L'ATRA cagé**

Nous avons discuté au chapitre 3 de la dynamique du gradient d'acide rétinoïque durant le développement du rhombencéphale. Les outils actuels ne permettent pas de contrôler l'activité de RA avec suffisamment de précision spatio-temporelle. La première partie de ma thèse a consisté à mettre au point une technique qui permet de contrôler la concentration d'acide rétinoïque dans un embryon de poisson zèbre de manière spatio-temporelle précise et résolutive. Avant mon arrivée dans le groupe, l'équipe du Prof. Ludovic Jullien avait déjà synthétisé différentes variantes d'un acide rétinoïque cagé (RA cagé) avec différents groupements protecteurs photolabiles. Le but était de réguler ainsi par photo-activation à deux photons la concentration d'acide rétinoïque dans un embryon de poisson zèbre vivant avec une haute précision dans l'espace et dans le temps. Dans ce chapitre, je vais commencer par présenter les outils actuellement utilisés pour étudier la voie de signalisation de RA. Ensuite, je présenterai les molécules cagées que j'ai étudié au cours de ma thèse. Finalement, je discuterai des problèmes rencontrés avec ces molécules.

### **4.1 Outils actuels pour contrôler l'activité de la voie de signalisation de l'ATRA**

L'ATRA est synthétisé par les RALDHs, puis capté dans le cytoplasme et transporté par les CRABPs pour s'associer avec des récepteurs nucléaires et activer ses gènes cibles. La stratégie la plus utilisée pour bloquer son activité (et que nous avons adopté) est de bloquer les RALDHs, ce qui entraîne la formation des embryons déficients en RA. Comme nous

l'avons vu, dans l'organisme, les rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDHs) convertissent le rétinal en acide rétinoïque. Il existe un inhibiteur réversible de cette enzyme: le diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB)<sup>[133]</sup>.

Expérimentalement, chez le poisson zèbre, on ajoute ces inhibiteurs dans le milieu environnant afin de bloquer l'action de l'ATRA endogène<sup>[134]</sup>. On ajoute ensuite, à différents stade de croissance des embryons, une concentration donnée d'acide rétinoïque qui diffuse de façon homogène dans tous les embryons. On peut aussi ajouter l'ATRA de manière plus locale par implantation de billes pré-absorbées en RA directement dans l'embryon<sup>[109][134]</sup>. Cependant cette technique ne permet pas de contrôler ou de connaître la concentration exacte de RA dans l'embryon. Par ailleurs, cette méthode ne permet pas de contrôler la fenêtre d'activation par RA : la voie RA est donc activée continuellement avec une concentration élevée et non contrôlée de RA. Afin d'étudier la dynamique de l'ATRA, une méthode qui permettrait de libérer RA à un temps et un endroit précis est nécessaire.

## 4.2 Principe du décageage

Une molécule cagée est à une molécule modifiée de façon à être liée avec un groupement photolabile qui bloque son activité. L'illumination de la molécule cagée à une longueur d'onde appropriée entraîne la rupture de la liaison covalente et l'activation de la molécule initiale. Grâce à cette méthode, on peut cager des molécules qui possèdent une activité biologique afin de manipuler leur activité par la lumière. En absence de lumière, le groupement cagé bloque son activité qui est restaurée par l'illumination à une longueur d'onde adéquate<sup>[135]</sup>.



### 4.3 L'ATRA cagé par le groupement protecteur o-nitrobenzyle

Dans le laboratoire du Pr. Ludovic Jullien, plusieurs RA cagés ont été synthétisés par une réaction d'estérification à l'aide de groupements protecteurs photolabiles différents. (Fig 4.1)

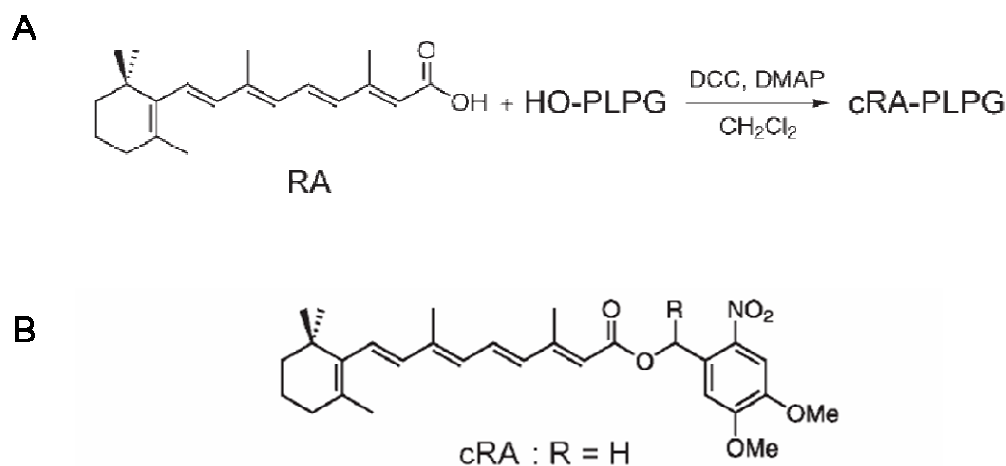


Figure 4.1. A) Réaction utilisée pour effectuer la synthèse de RA cagé (cRA). Une molécule de RA se lie avec une molécule d'alcool contenant un groupement protecteur photolabile (Photolabile protecting group PLPG) pour donner un ester : cRA cagé. B) Structure de cRA<sup>[136]</sup>.

La cinétique de photo-déprotection du RA cagé par le groupement protecteur o-nitrobenzyle (cRA) a été bien caractérisée dans une solution Tris pH9/acétonitrile. L'illumination de cRA par les UV (365 nm) entraîne trois types de réaction. Avec la source lumineuse classiquement utilisée (lampe UV de paillasse 4 ou 6 W), on observe une réaction d'isomérisation de l'axe polyénique du cRA pendant les 20 premières secondes.

Entre 20 et 400 s, la réaction de photodécageage génère les différents isomères de RA y compris l'ATRA. Au bout de 2000 s, on observe une réaction de photodégradation<sup>[136]</sup>.

L'ancien thésard du laboratoire, Pierre Neveu, avait observé qu'en incubant les embryons de poisson zèbre dans 10  $\mu$ M de cRA pendant 90 min puis en les illuminant pendant 1 min, les embryons développaient un phénotype analogue à celui observé lors de l'incubation dans le ATRA (raccourcissement de l'axe, sévère malformation de la tête et disparition de l'œil). Il avait conclu que cRA pouvait être décagé par une lampe UV à 365 nm et que le rendement du décageage était de 10 %. On pouvait donc décager en principe 1 nM de RA à partir de 10 nM de cRA<sup>[136]</sup>. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à reproduire les conditions expérimentales pour reproduire ce phénotype ; dans les conditions que nous avons explorées, les embryons incubés dans cRA puis illuminés ne présentaient aucun phénotype de malformation similaire à celui observé avec les embryons qui avaient été incubés dans l'ATRA. Après plusieurs tentatives et des modifications infructueuses du protocole, on s'est posé la question de savoir d'où venait cette irréproductibilité(Fig 4.2)

Le RA est une molécule peu soluble dans l'eau. On observe ainsi à l'œil nu qu'une solution de 10  $\mu$ M de RA forme des agrégats dans le milieu de poisson. Cela nous a conduit à penser qu'il y avait un problème de solubilité. On a donc réalisé une série de tests de spectrophotométrie UV pour évaluer cette hypothèse.(Figure 4.2)

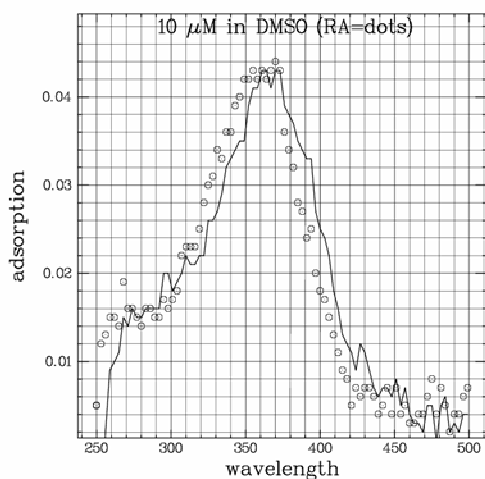
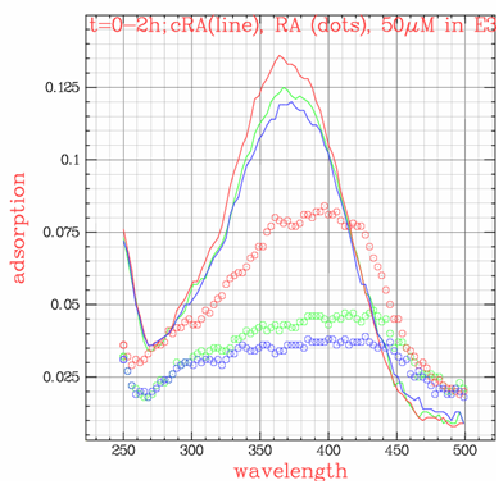
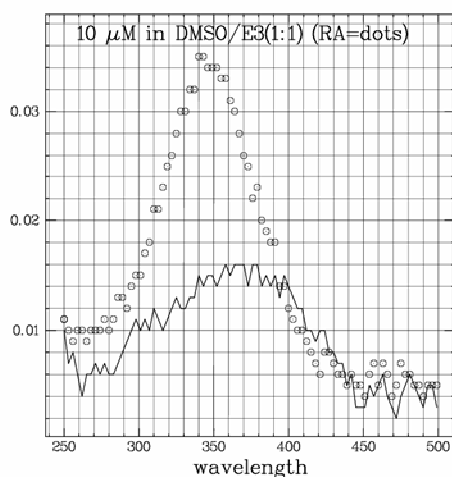
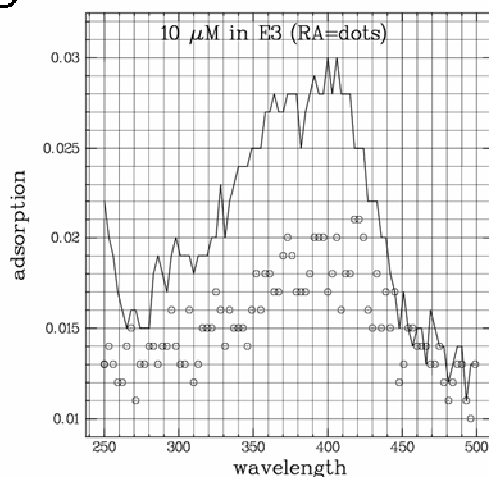
**A****B****C****D**

Figure 4.2. Spectres UV de RA et cRA dans différents milieux et au cours du temps. A) milieu organique DMSO : le spectre n'évolue pas au cours du temps, ce qui suggère que cRA est bien solubilisé ; B) milieu aqueux : l'absorbance diminue au cours du temps, ce qui suggère une précipitation. On retrouve ce même comportement dans un milieu mélangé de DMSO et d'eau (C) ainsi qu'avec RA en milieu aqueux E3 (D).

Figure 4.2 a montré que le RA et cRA sont tous deux solubles dans le solvant organique DMSO. Le pic d'absorbance est vers 365 nm pour cRA et 343 nm pour ATRA. Dès qu'il y a

présence de l'eau dans le milieu, le pic d'absorption de cRA diminue et s'accompagne d'un déplacement spectral vers le rouge, ce qui signifie qu'il y a une formation d'agrégats. Dans le milieu de poisson E3, le pic d'absorption de RA diminue aussi et il présente également un déplacement spectral vers le rouge au bout de 2 h. Ces résultats confirment l'hypothèse qu'il y a un problème de solubilité de cRA en milieu aqueux. C'est probablement pour cette raison qu'on n'observe pas le phénotype de malformation ATRA : la concentration de cRA dans le milieu aqueux est trop faible pour que le décaage produise des quantités suffisantes d'ATRA.

Comme cRA est très soluble en milieu organique, mais peu dans une solution aqueuse, on a pensé à utiliser des complexants ou des surfactants pour diminuer la formation d'agrégats. Ce sont des macromolécules qui pourraient disperser les molécules de cRA et ainsi empêcher la formation d'agrégats. Plusieurs complexants et surfactants ont été utilisés et l'évolution temporelle des spectres d'absorption de cRA en leur présence a été étudiée : BSA (0.1mg/ml) (Figure 4.3C), pluronic (0.1g/ml) (Figure 4.3B), tween (10  $\mu$ M) (Figure 4.3A) et triton (1% W/V) (Figure 4.3D).

Parmi les additifs étudiés, seuls BSA et triton ont fourni des résultats satisfaisants. Pour l'ATRA, le pic d'absorption est étroit et on n'observe pratiquement pas de déplacement spectral vers le rouge. Dans le cas du cRA, le problème d'agrégation semble être de même résolu dans ces conditions. Ces résultats suggéraient que l'on puisse utiliser ces additifs lors de l'étape d'incubation des embryons. On a ainsi testé ces conditions d'incubation en plaçant les embryons dans une solution de cRA en présence de BSA ou de triton. Les embryons de poisson zèbre ne peuvent pas survivre dans la solution contenant le triton. En revanche, ils

peuvent survivre en présence de BSA. Cependant l'ajout de BSA n'a pas amélioré le problème de reproductibilité. Nous n'avons toujours pas observé de phénotype de malformation après l'incubation dans une solution de cRA en présence de BSA suivie d'une illumination UV. On a alors décidé d'arrêter ce projet et de nous tourner dans une autre direction pour le même l'objectif mais cette fois en mobilisant non pas un groupement protecteur photolabile mais les propriétés photochimiques de l'ATRA lui-même.

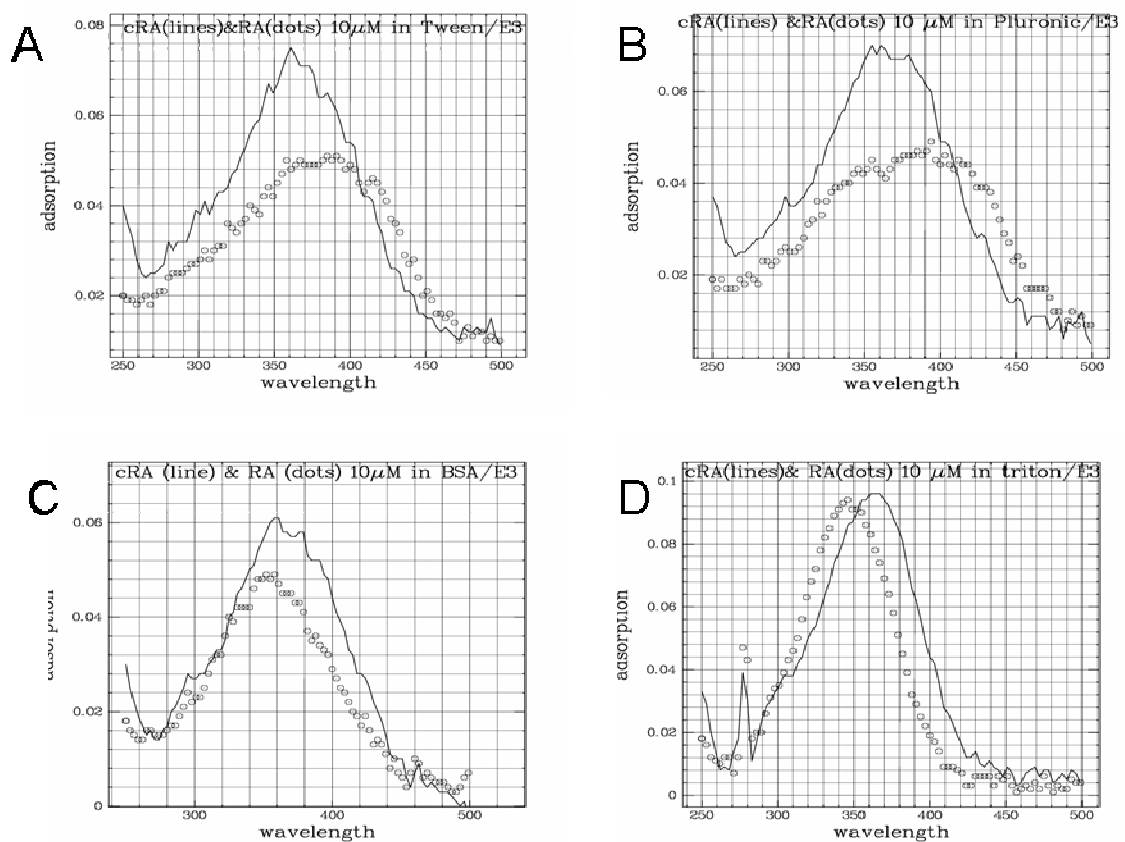


Figure 4.3. Spectre UV de RA et cRA en milieu aqueux en présence de différents complexants ou surfactants. A : Tween, B : Pluronic, C : BSA, D : Triton.

## Chapitre 5 Isomérisation de l'ATRA

Nous avons déjà vu dans les précédents chapitres que les rétinoïdes (vitamine A et ses dérivés) sont des substances puissantes pouvant réguler l'expression d'un grand nombre de gènes dans l'embryon, en particulier ceux qui sont responsables du développement du rhombencéphale. L'activité régulatrice des rétinoïdes sur leurs gènes cibles est médiée principalement par l'ATRA. Cependant, les rétinoïdes sont très riches en doubles liaisons qui peuvent s'isomériser par la chaleur, dans un environnement acide et par la lumière. L'isomérisation des rétinoïdes permet de changer la conformation de la protéine associée (membranaire ou nucléaire) et ainsi de moduler son activité. Ainsi la photo-isomérisation du 11-cis rétinol en all-trans-rétinol joue un rôle essentiel dans le cycle de la vision chez les mammifères. D'autres isomères de l'ATRA peuvent jouer un rôle dans la régulation génétique, c'est le cas de 9-cis RA. Par ailleurs, bien que le 13-cis RA n'ait pas d'activité régulatrice avérée lors du développement, il est utilisé comme un agent efficace dans le traitement pharmacologique d'une variété de conditions dermatologiques et de cancers. Dans ce chapitre, nous exposerons dans la première partie, le principe de l'isomérisation trans-cis. Ensuite, nous allons présenter le cycle de vision qui implique l'isomérisation trans/cis du 11-cis rétinol. A la fin, nous allons présenter les deux isomères de ATRA ainsi que leur mécanisme d'action dans diverses conditions biologiques.

### 5.1 L'isomérisation cis/trans

En chimie organique, l'isomérisation cis/trans (également connue sous le nom d'isomérisation géométrique) est une forme de stéréo-isomérie décrivant l'orientation des groupes fonctionnels dans une molécule. En général, ces isomères contiennent des doubles liaisons ou une structure cyclique qui empêche une rotation aléatoire, ce qui entraîne la formation d'isomère cis ou trans. Ces isomères sont observés à la fois dans des molécules organiques et des complexes contenant des éléments inorganiques.

Les termes cis et trans proviennent du latin : cis signifie du même côté et trans de l'autre côté. Dans un composant à double liaison, si deux groupements sont situés du même côté de la double liaison, l'isomère sera dénommé cis. Par contre si les deux groupes sont situés de part et d'autre de la double liaison, cet isomère sera défini comme trans (Fig. 5.1).

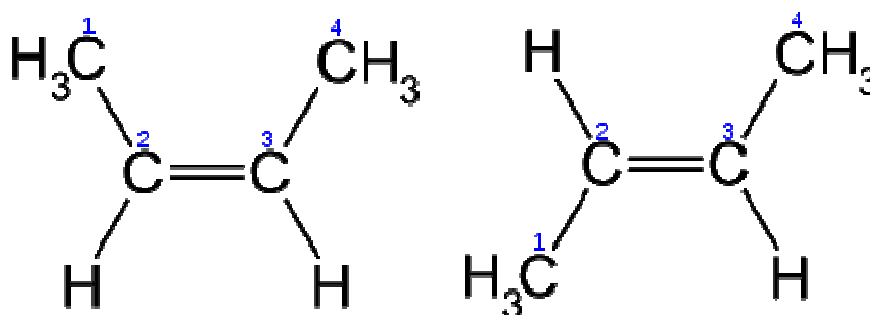


Figure 5.1. Structure des deux isomères cis/ trans du butène-2. Cis-but-2-ène (à gauche) et Trans-but-2-ène (à droite).

Dans un composé cyclique, si les deux substituants sont situés du même côté (respectivement de part et d'autre) du plan moyen du cycle, le composé est dénommé cis (respectivement trans) (Fig. 5.2).

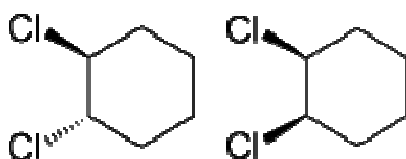


Figure 5.2. Exemple d'un composant acyclique: le 1,2-dichlorocyclohexane. trans-1,2-dichlorocyclohexane (à gauche) et cis-1,2-dichlorocyclohexane (à droite).

Habituellement, les isomères trans sont thermodynamiquement plus stables que les isomères cis. A l'échelle d'une molécule, cela résulte d'une moindre répulsion stérique. La forme rectiligne des isomères trans peut conduire par ailleurs à des liaisons hydrogène intermoléculaires qui peuvent les rendre plus stables. Toutefois, cette règle n'est pas absolue : dans certains cas tels que les 1,2 - dihalo-éthylène ou 1,2 - difluoro-diazényl, les effets électrostatiques jouent un rôle important et l'isomère cis est plus stable que l'isomère trans(Livre de Richard C. Bingham 1976).

## **5.2 L'isomérisation du 11-cis rétinol dans le cycle de la vision**

A cause de leur rôle essentiel dans la vision, le comportement photochimique des rétinoïdes naturels a été très étudié. Ceux-ci sont riches en doubles liaisons ce qui permet leur isomérisation par la lumière. La rétine détecte la lumière par des cellules photo-réceptrices. Chez l'homme, deux types de photorécepteurs détectent la lumière dans des conditions différentes. Les bâtonnets sont très sensibles à une faible intensité lumineuse, tandis que les cônes assurent la vision diurne multispectrale. Le rétinol 11-cis dans les cônes et les bâtonnets est lié de façon covalente à une protéine transmembranaire dénommée opsine pour former une molécule de pigment visuel<sup>[137]</sup>. Dans l'obscurité, le rétinol 11-cis se lie à l'opsine comme un agoniste et maintient celle-ci dans une conformation inactive. Lorsque la lumière est absorbée par le pigment visuel, l'isomérisation du rétinol 11-cis en rétinol all-trans dans la poche de liaison force l'opsine en une conformation active et initie la phototransduction. Alors que le



rétinol all-trans nouvellement formé est nécessaire afin d'activer l'opsine, il manque de photosensibilité (Fig. 5.4). L'opsine doit libérer le rétinol all-trans et se lier de nouveau au rétinol 11-cis afin de continuer à être sensible à la lumière. De nouvelles molécules de rétinol 11-cis doivent être produites afin de maintenir le fonctionnement des photorécepteurs<sup>[138]</sup>. Dans le cas des bâtonnets, le rétinol all-trans est réduit en rétinol all-trans dans une réaction catalysée par la rétinol déshydrogénase NADPH-dépendante. Ensuite, le rétinol all-trans diffuse dans la couche de cellules RPE (cellules épithéliales pigmentées de la rétine) adjacentes. Ce processus est activé par l'estérification du rétinol par des acides gras dans une réaction catalysée par la lécithine rétinol acyltransférase. Dans les cellules RPE, les rétinyl esters all-trans ont tendance à former des structures intracellulaires appelées rétinosomes. Ces esters vont servir de substrats à la rétinol isomérase RPE65, qui les convertit en rétinol 11-cis, qui est ensuite oxydé en rétinol 11-cis par des rétinol déshydrogénases. Le rétinol 11-cis ainsi formé dans les cellules RPE diffuse alors vers les bâtonnets et boucle ainsi le cycle de la vision en se reliant avec l'opsine pour former la rhodopsine<sup>[139]</sup>.

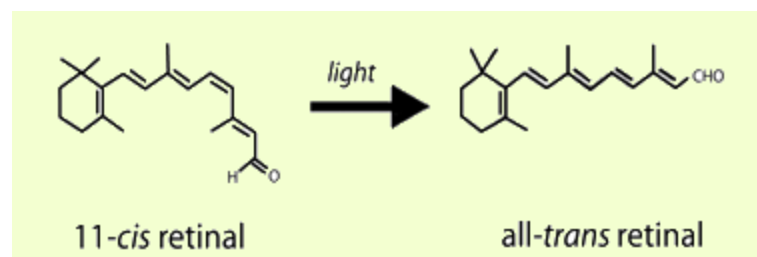


Figure 5.3. Le rétinol 11-cis est le composant sensible à la lumière des photorécepteurs : bâtonnets et cônes. Dans la première étape de la vision, les photorécepteurs sont activés lorsque la lumière induit l'isomérisation du rétinol 11-cis en rétinol all-trans.

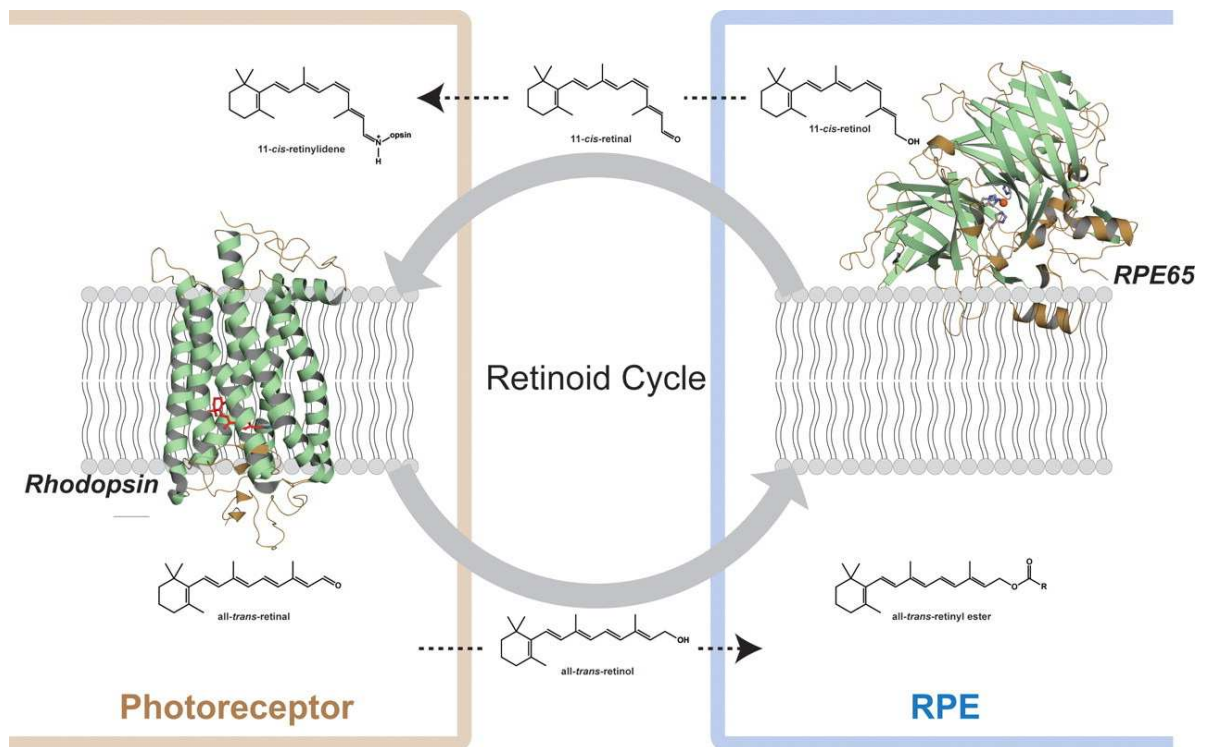


Figure 5.4. Le cycle de la vision implique le recyclage des rétinoïdes entre les segments des bâtonnets externes et les cellules RPE (cellules épithéliales pigmentées de la rétine). Le cycle de la vision commence dans le segment externe avec la libération du rétinol all-trans de l'opsine. Après réduction en rétinol all-trans, ce dernier traverse l'espace sous-rétinien et entre dans les cellules RPE. Le rétinol 11-cis est régénéré en plusieurs étapes enzymatiques pour finir par se lier à nouveau aux photorécepteurs<sup>[138]</sup>.

### 5.3 Cinétique de la photoisomérisation de l'ATRA

La cinétique de la photoisomérisation de l'ATRA se fait en 3 étapes avec une lampe UV à 365nm (6W). Les 20 premières secondes d'illumination correspondent au temps de relaxation associé à la photoisomérisation : on observe une forte diminution de ATRA et une augmentation de 13-cis RA et de 9-cis RA. Entre 100-1000 secondes d'illumination, à cause de leurs longueurs d'onde d'absorption maximales très proches (ATRA : 350 nm, 9-cis RA :

345 nm, 13-cis RA : 354 nm)<sup>[140]</sup>, les 3 stéréo-isomères restent dans un état photo-stationnaire dans lequel ils se photo-isomérisent de manière dynamique mais leurs proportions relatives restent constantes. Au bout de 2000s, ces 3 isomères se dégradent sous illumination UV<sup>[136]</sup>.

## **5.4 L'isomère 9-cis RA et son rôle dans le développement du rhombencéphale**

Plusieurs études ont montré que les RXR ne peuvent lier que l'isomère 9-cis RA, tandis que les RAR peuvent lier aussi bien l'isomère 9-cis que le tout-trans.<sup>[141]</sup> Historiquement, l'existence du 9-cis RA in vivo fut controversée car une seule étude a décrit sa détection dans des tissus de souris par analyse HPLC<sup>[142]</sup>. Cela est peut-être dû à un manque de méthodes d'analyses suffisamment sensibles. En outre, le rôle du 9-cis RA a été exclu dans certaines situations physiologiques, comme dans la peau chez la souris, par une élégante approche génétique et pharmacologique (utilisation d'agonistes et d'antagonistes des RAR et RXR)<sup>[143]</sup>. La question de la fonction physiologique du 9-cis RA reste donc en suspens<sup>[144]</sup>. De récentes études par chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS) ont permis de détecter du 9 cis RA dans le pancréas de souris, produit en particulier par les cellules Beta, ce qui suggère un possible rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline<sup>[145]</sup>. Le fait que les isotypes de RXR puissent lier le 9-cis RA pose la question du rôle respectif de chaque partenaire du dimère RAR-RXR dans la fonction d'activation de la transcription. Or il a été montré que la liaison d'un ligand au partenaire RAR, mais pas au RXR, suffit à induire la dissociation des coactivateurs du dimère RAR-RXR<sup>[146]</sup>. Ce phénomène a été baptisé « subordination du RXR ». Toutefois la liaison simultanée d'un

ligand à chacun des partenaires du dimère RAR-RXR semble induire la dissociation des corepresseurs et le recrutement des coactivateurs de façon synergique<sup>[147]</sup>. Or il a été proposé que les RXR puissent avoir d'autres ligands que le 9-cis RA, comme certains acides gras<sup>[144]</sup>. Cela indique que d'autres voies de signalisation ou de voies métaboliques pourraient moduler l'activité transcriptionnelle des dimères RAR-RXR via le partenaire RXR.

Dans la plupart des espèces étudiées, l'isomère all-trans RA (ATRA) a été détecté dans des embryons entiers ou lors du développement du tube neural. Ceux-ci incluent le poisson-zèbre<sup>[148]</sup>, le poulet<sup>[149]</sup> et la souris<sup>[150]</sup>. Chez certaines espèces, d'autres espèces reliées à l'ATRA ont également été détectées. Dans le tube neural de l'embryon de poulet, en particulier, le 3,4-didéhydro-ATRA est présent en plus grande abondance que l'ATRA<sup>[149][151]</sup>. Chez le Xénope, les premières études ont montré la présence de l'ATRA et de 9-cis-RA<sup>[86]</sup>. En revanche, des études ultérieures, en utilisant une méthode de détection plus sensible, ont montré que l'isomère 9-cis RA n'est pas détectable de manière reproductible, tandis que le 4-oxo-ROL, 4-oxo-RAL, et 4-oxo-RA étaient présents en abondance, et étaient bioactifs<sup>[70]</sup>. Probablement à cause de la mauvaise identification de 9-cis-RA chez *Xenopus*<sup>[86]</sup><sup>[70]</sup>, et l'incapacité à détecter le 9-cis-RA en tissu neural chez les autres espèces, il est remarquable que deux études ont observé une forte activation du gène rapporteur dans le tube neural en utilisant une construction rapportrice spécifique à 9-cis-RA. Solomin et al., ont utilisé une souris transgénique dans lesquelles l'activation de RXR conduit à l'expression de Gal4<sup>[152]</sup>. Luria et Furlow, en utilisant un analogue RXRa-Gal4 chez le Xénope, ont observé l'activité du rapporteur dans le tube neural<sup>[153]</sup>. L'activité de rapportrice médiée par RXR ne s'étend pas de façon détectable dans le cerveau postérieur chez les souris et xénopes. Ces

résultats indiquent que les RXR sont activés et puisque les RXR sont généralement considérés comme les récepteurs du 9-cis-RA, il est probable que du 9-cis-RA soit présent dans la moelle épinière au même endroit que l'ATRA et que les deux pourraient diffuser dans le cerveau postérieur. Cela pourrait éventuellement être cohérent avec l'absence de détection biochimique de 9-cis-RA si 9-cis-RA est produit par un faible nombre de cellules ou à des concentrations plus faibles que l'ATRA. Cependant, deux autres explications peuvent exister. Tout d'abord, les RXRs peuvent être activés par des ligands non-rétinoïdes<sup>[154]</sup> et par d'autres mécanismes de fixation du ligand<sup>[155]</sup>. Deuxièmement, même si les RXR se lient au 9-cis-RA avec beaucoup plus d'affinité que l'ATRA, ils peuvent se lier et être activés par l'ATRA avec une faible activité<sup>[141]</sup>, et cette activité pourrait être révélée si 9-cis-RA était totalement absent. En tout cas, il semble plus probable que l'ATRA soit la principale forme endogène de l'ATRA agissant lors du développement du cerveau postérieur dans la plupart des espèces. Il est néanmoins possible que le 9-cis-RA puisse être impliqué dans ce développement et qu'il existe entre différentes espèces des concentrations relatives différentes de ces rétinoïdes.

## 5.5 Le 13-cis RA

Le 13-cis RA est naturellement généré par l'organisme. Cette molécule a été utilisée en tant que médicament pour traiter de nombreuses maladies telles que l'acné, le psoriasis et le cancer. Il a été montré que le traitement par le 13-cis RA entraîne des effets secondaires, notamment la dépression<sup>[156]</sup>. Mais le mécanisme exact de ses effets n'a pas été totalement élucidé. Des études sur les cellules en culture montrent que le 13-cis RA modifie la morphologie cellulaire et le récepteur sérotoninergique (5-HT<sub>1A</sub>)<sup>[156]</sup>. L'action

transcriptionnelle de 13-cis RA s'effectue par un des deux mécanismes (Fig. 5.5) : 1) Le 13-cis RA peut s'isomériser en ATRA puis se lier avec RARs pour initier la transcription. 13-cis RA exerce son activité spécifiquement sur les sebocytes humaines via isomérisation sélective intracellulaire sur ATRA et lier aux RAR. <sup>[157]</sup> 2) Le 13-cis RA lui-même est le ligand de RARs. Malgré sa faible affinité sur les RARs par rapport à l'ATRA(100 fois moins), il est toujours capable d'activer des RARs <sup>[158][141]</sup>. L'excès de 13-cis RA entraîne moins de malformation fœtale que ATRA et 9-cis RA, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'action directe de cet isomère durant l'embryogénèse<sup>[159]</sup>.

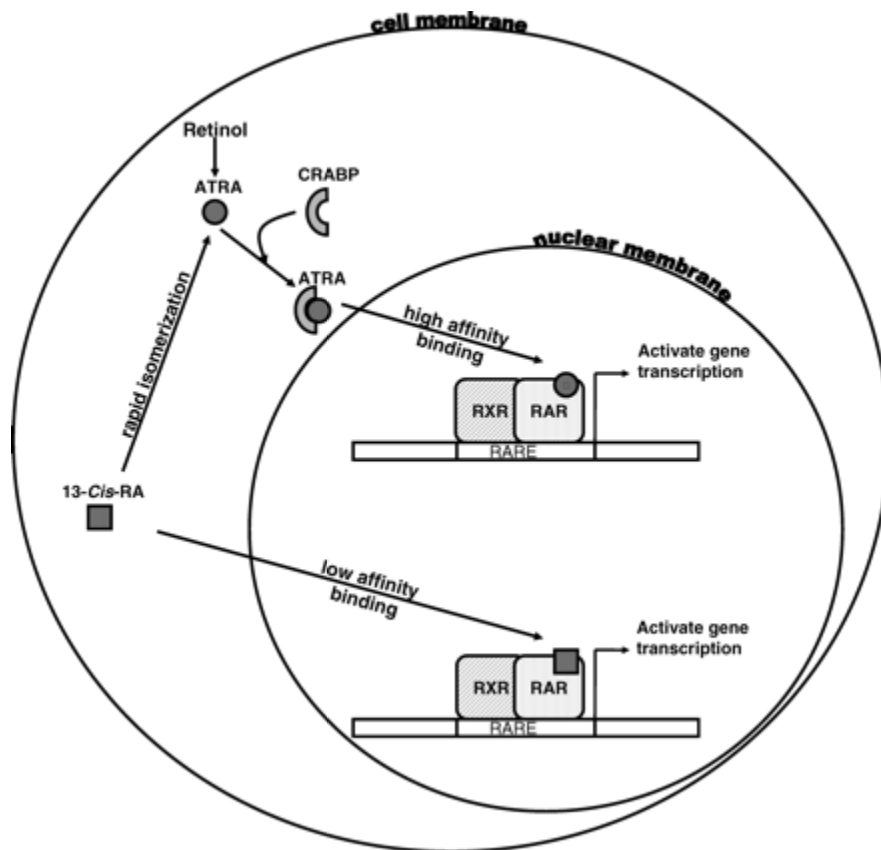


Figure 5.5. Mécanisme d'action de 13-cis-RA. 13-cis-RA peut s'isomériser en ATRA et se lie alors au RAR pour initier la transcription du gène, ou 13-cis-RA peut directement se lier au RAR<sup>[156]</sup>.

## Chapitre 6 : Introduction sur les publications

### 1<sup>ère</sup> publication

Nous avons vu précédemment que le gradient d'acide rétinoïque est essentiel à la segmentation du rhombencéphale. Au cours de ma thèse, j'ai étudié en particulier la voie de l'acide rétinoïque dans la formation du rhombomère r5. Avant de présenter les résultats, il est important d'introduire les facteurs clés qui sont impliqués dans la formation de ce territoire.

Sous le contrôle de signaux postérieurs, les gènes de segmentation tels que *krox20* et *valentino* (*kreisler* chez la souris) sont connus pour être activés spécifiquement dans leurs futurs rhombomères. *krox20* code pour un facteur de transcription à doigt de zinc et son expression est limitée aux rhombomères r3 et r5 <sup>[160]</sup>. L'inactivation de Krox20 montre une perte de r3 et r5 et suggère un rôle indispensable de *krox20* dans ces rhombomères <sup>[161][162]</sup>. Valentino est un facteur de transcription à domaine leucine-zipper basique requis pour la segmentation de r5/r6. Il a été identifié dans un criblage de mutations pour les gènes responsables de la régionalisation du cerveau <sup>[163]</sup>. Il est exprimé dans la partie postérieure du futur rhombencéphale dans un territoire qui préfigure puis correspond à r5 et r6 <sup>[163]</sup>. Chez le mutant de *val*, le domaine destiné à former r5/r6 a la taille d'un seul rhombomère. On y observe également une perte des marqueurs spécifiques de r5/r6 par l'extension caudale des marqueurs de r4 et une extension rostrale de marqueurs de rhombomère plus caudaux <sup>[163]</sup>. Ces gènes sont connus pour activer les gènes *hox* en aval de leur domaine d'expression : l'expression des gènes *hox* est essentielle à la détermination de l'identité des rhombomères selon l'axe antéro-postérieur. Une série d'analyses sur les séquences régulatrices des gènes

*hoxa3* et *hoxb3* montre que leur expression dans r5-r6(*Hoxa3*) et r5(*Hoxb3*) est sous contrôle direct de Val. <sup>[164]</sup> Independent regulation of initiation and maintenance phases of *Hoxa3* expression in the vertebrate hindbrain involve auto- and cross-regulatory mechanisms <sup>[164][165]</sup>. La mutation de *valentino* entraîne aussi la disparition de *krox20* dans r5 <sup>[163]</sup>.

Un autre gène très important impliqué dans la segmentation du r5 est *vHnf1*. Ce gène code pour un facteur de transcription à homéodomaine atypique de type POU. L'expression de *vHnf1* commence peu avant le début de la somitogénèse dans un large domaine de la plaque neurale<sup>[134]</sup>. Plus tard, son domaine d'expression devient plus limité et correspond à la frontière r4/r5 puis il disparaît au stade 8 somites<sup>[166]</sup>. Sun et Hopkins ont étudié un mutant de *vHnf1* chez poisson zèbre<sup>[166]</sup>. La mutation de *vHnf1* entraîne une perte de segmentation du rhombencéphale postérieurement à r4. Dans ce mutant, l'expression de *val* dans r5-r6 ainsi que celle du marqueur de r5 *krox20* ont disparu. La surexpression de *vhnf1* entraîne une disparition du marqueur de r4 et une expansion de *krox20* dans r5 et de *val* dans r5/r6. Ces données suggèrent l'importance de *vhnf1* dans la segmentation du rhombencéphale caudal, en particulier r5/r6. L'analyse de la séquence régulatrice de Val et *Krox20* montre que tous deux possèdent un site de fixation de *vHnf1*<sup>[167]</sup>. De plus, l'étude sur la fonction de *vhnf1* en relation avec l'expression de FGF3 et FGF8 dans r4 montre que *vHnf1* et FGF3/8 interagissent en synergie pour spécifier r5/r6 en particulier Val.

L'analyse d'embryons mosaïques chez le poisson montre que les cellules mutantes pour *vHnf1* ou *MafB* se comportent de la même manière, suggérant que l'essentiel des fonctions de *vHnf1* dans la formation du r5 passe par Val et *Krox20*. L'utilisation d'inhibiteur de la synthèse d'ATRA (acide rétinoïque all-trans) entraîne une disparition de *krox20* dans le



domaine r5<sup>[134]</sup> ce qui s'explique car *vhnf1* est une cible directe d'ATRA. En effet, des études ont montré qu'ATRA est nécessaire et suffisant pour induire l'expression de *vHnf1*. Il existe un élément de réponse à ATRA (RARE) dans l'élément cis régulateur de *vHnf1* du rhombencéphale<sup>[168]</sup>. Les embryons de poisson zèbre incubés dans un inhibiteur de la synthèse d'ATRA (DEAB) montrent une perte d'expression de *val* dans r5/r6 et *krox 20* dans r5<sup>[134]</sup>.

## 2<sup>ème</sup> publication

J'ai présenté dans le chapitre 4 qu'on a synthétisé une molécule d'ATRA cagée pour activer la voie d'ATRA avec une haute résolution spatio-temporelle. A cause de sa faible solubilité dans l'eau, on n'a pas pu aller plus loin dans cette voie. Par contre, dans le laboratoire du Prof. Jullien, d'autres molécules cagées sont synthétisées. L'objectif est de contrôler l'activité d'une protéine d'intérêt de manière spatio-temporelle dans un organisme vivant. Le tamoxifène est un antagoniste d'œstrogène. Au laboratoire, cette molécule est utilisée pour activer une protéine recombinante entre le récepteur d'œstrogène (ER) et la protéine d'intérêt. En absence de tamoxifène, l'activité de la protéine recombinante est inhibée car l'ER est lié avec hsp90 ; la protéine recombinante ne peut pas rentrer dans le noyau. En présence de tamoxifène, ce dernier se fixe sur l'ER et en change ainsi la conformation. La protéine recombinante devient donc active. Chez la souris comme chez le poisson zèbre, cette stratégie peut être combinée avec le système Cre-lox pour activer ou inactiver une protéine spécifique de manière irréversible et spatio-temporelle grâce au promoteur spécifique de Cre<sup>[169][170]</sup> (Le système Cre-lox est illustré dans le chapitre 1, Fig. 1.3).

Dans le laboratoire du Prof. Jullien, on veut contrôler ce système par la lumière pour améliorer la résolution spatio-temporelle. Pour cela, il faudrait un tamoxifène lié avec un groupement protecteur qui puisse être déprotégé par la lumière. La nature chimique du tamoxifène fait que cette molécule n'est pas favorable pour mettre en œuvre des réactions de photodéprotection. En effet, comme pour ATRA, elle possède 2 stéréo-isomères. Seul l'isomère Z est biologiquement actif. Cela veut dire qu'en illuminant cette molécule, on va

perdre environ 50% de son efficacité. Tout comme ATRA, le tamoxifène est dégradé sous illumination UV prolongée. Le laboratoire du Prof Jullien a donc choisi de développer un analogue du tamoxifène qui ne possède qu'un unique stéréoisomère et qui soit stable sous illumination à 365 nm. Il s'agit d'un dérivé du cyclofénil possédant la chaîne éthylamino du tamoxifène. Cette molécule nommée cyclofène possède toute l'activité du tamoxifène et peut être liée à un groupement protecteur photolabile pour photo-contrôler l'activité d'une protéine d'intérêt<sup>[169][170]</sup> (Fig. 6.1).

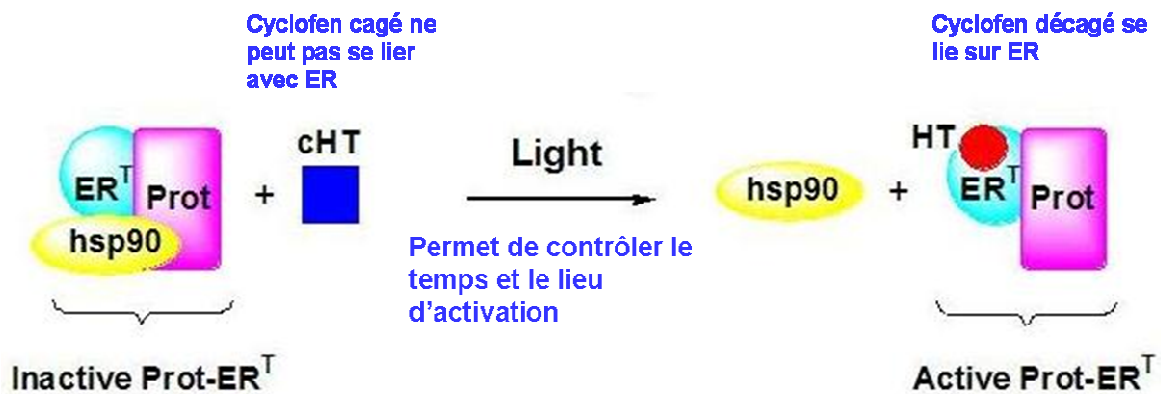


Figure 6.1. Principe du cyclofène cagé. Ce système permet d'activer ou d'inactiver une protéine par illumination avec une haute résolution spatio-temporelle.

A ce jour, la plupart des groupements protecteurs photolabiles absorbent la lumière à une longueur d'onde inférieure à 450 nm. Cette lumière peut aussi être absorbée par les caroténoïdes, la riboflavine et le flavine mononucléotide contenus dans les cellules<sup>[171]</sup>. L'illumination par cette lumière pourrait elle-même ainsi déterminer une réponse biologique. Dans ce projet, on a modifié un groupement protecteur coumarine qui absorbe généralement à 365 nm en lui substituant un atome d'oxygène par un atome de soufre, ce qui déplace son spectre d'absorption vers le rouge. Par une série de réactions chimiques, on obtient le groupement thiocoumarine qui absorbe à 467 nm. Ce nouveau groupement protecteur est

ensuite lié au cyclofène pour être utilisé chez l'embryon de poisson zèbre injecté par un plasmide qui exprime une protéine recombinante engraild-ER. Les tests in vivo sur l'embryon de poisson zèbre montrent que le cyclofène-thiocoumarine est capable d'activer l'expression de engraild2 suite à une illumination à 470 nm. L'illumination par une lampe à 470 nm entraîne un phénotype perte de l'œil, qui correspond au phénotype sur-expression de engraild2 chez le poisson zèbre. Sans illumination, les poissons injectés par le plasmide engraild2-ER se développent normalement. On a ensuite réalisé une expérience de photodéprotection croisée entre le cyclofène-thiocoumarine et 13-cis RA (maximum d'absorption à 365 nm). L'illumination d'embryons incubés dans le 13-cis RA et le cyclofène-thiocoumarine à 365 nm peut sauver le phénotype de malformation du rhombencéphale et n'entraîne pas de malformation de l'œil. Inversement, l'illumination de ces poissons à 470 nm entraîne une malformation de l'œil sans récupération de leur rhombencéphale. Cela nous permet de vérifier que l'illumination est bien orthogonale.

# Conclusion et perspectives

## Conclusion sur la thèse

Au cours de ce projet, j'ai développé une méthode simple et quantitative pour étudier la voie d'ATRA de façon quantitative et avec une grande résolution spatio-temporelle dans le rhombencéphale du poisson zèbre. Cette méthode est basée sur la transformation entre 13-cis RA et ATRA par photoisomérisation. Nous avons sélectionné le 13-cis RA à cause de sa faible activité biologique. J'ai commencé par réaliser une série de tests physico-chimiques pour tester l'efficacité de la réaction d'isomérisation d'ATRA après illumination par UV. J'ai quantifié les produits issus de la photoisomérisation de 13-cis RA par chromatographie. Parmi ceux-ci on trouve notamment 20% d'ATRA et 30% de 9-cis RA. J'ai testé l'effet de 13-cis RA et 9-cis RA sur les embryons de poisson zèbre et démontré que sans illumination, l'activité de ces deux isomères est négligeable en comparaison avec celle d'ATRA. Par la suite, j'ai observé que suite à une illumination globale de 1 min aux UV, 5 nM de 13-cis RA peut sauver le phénotype de malformation du rhombencéphale comme le ferait une incubation des embryons dans 1 nM d'ATRA pendant 5 min. J'ai quantifié ces effets par la mesure de la fluorescence de la GFP exprimée dans les rhombomères r3 et r5 d'un poisson transgénique provenant du laboratoire du Prof. Shuo Lin à UCLA. J'ai aussi quantifié cette réponse en mesurant par RT-qPCR l'expression de certains gènes cibles de RA. Grâce à cette méthode, on peut aussi inactiver la voie RA en photoisomérisant l'ATRA vers d'autres isomères moins actifs et cela en une seule minute d'illumination UV. Cela m'a permis de contrôler l'activité de la voie RA pendant un laps de temps très précis. Enfin, nous avons aussi isomérisé le 13-cis RA localement dans un embryon vivant par une illumination à l'aide d'un laser UV.

Cette méthode nous permet donc d'activer ou d'inactiver la voie RA avec une grande précision spatio-temporelle et une concentration connue et physiologique ( $< 1\text{nM}$ ). Il est désormais possible d'aborder de nombreuses questions sur la dynamique de la voie RA.

## **Perspectives**

### **Nature du gradient**

Au troisième chapitre, j'ai présenté les 3 modèles actuels du développement du rhombencéphale qui supposent l'établissement d'un gradient d'ATRA. Un des désaccords principaux entre ces trois modèles concerne le rôle du temps d'exposition à ATRA. Les outils actuels ne permettent pas de se déterminer avec suffisamment de précision sur la fenêtre d'activation d'ATRA dans l'embryon. Maves et Kimmel (2005) ont suggéré que l'ATRA était essentiel pour l'initiation des gènes cibles mais pas pour leur maintien<sup>[134]</sup>. Dans leurs études ils traitent les embryons de poisson zèbre par l'inhibiteur de synthèse de RA (DEAB) à différents stades de développement (entre 4hpf et 11hpf). L'expression de RALDH2 commence chez le poisson zèbre au stade de gastrulation, l'ATRA déjà synthétisé peut être activé et servir à maintenir l'expression des gènes cibles. Même si des inhibiteurs de RARs existent, le temps qu'ils diffusent dans l'embryon est difficile à mesurer. Grâce à notre méthode, on peut facilement adresser à cette question, on peut ajouter l'ATRA dans le milieu de croissance et laisser les embryons incubés pendant un temps variable. On peut ensuite illuminer les embryons aux UV pour inactiver (partiellement) la voie RA et voir si l'expression des gènes cibles est toujours observée. On peut ainsi déterminer le temps minimum nécessaire à l'activation des gènes cibles.

Un facteur très important dans ces 3 modèles est la nature du gradient endogène d'ATRA dans le rhombencéphale. Dans les études de White *et al* (2007)<sup>[109]</sup>, après implantation de billes absorbées d'ATRA (à une concentration de plusieurs  $\mu\text{M}$ ), un gradient artificiel et mal contrôlé est créé<sup>[109]</sup>. On observe alors que ce gradient de RA peut induire l'expression de CYP26a1, l'enzyme qui dégrade RA à son tour et limite son activité dans la partie antérieure du rhombencéphale. Cependant les solutions dans lesquelles les billes sont incubées (entre  $10\mu\text{M}$  et  $1\text{mM}$ ) dépassent largement la concentration physiologique ( $< 1\text{nM}$ ), et par ailleurs la concentration exacte de RA dans l'embryon est inconnue, ce qui met en question l'interprétation de ces résultats. Grâce à notre méthode, il est maintenant possible d'illuminer des embryons pré-incubés dans 13-cis RA puis de les illuminer par un laser UV. Cela permet d'activer RA à un endroit précis avec une concentration connue puis que l'on connaît le rendement de l'isomérisation de 13-cis RA en ATRA ( $\sim 20\%$ ). Cela peut permettre d'étudier les effets d'un gradient d'ATRA sur ses gènes cibles dans des conditions mieux contrôlées et plus proches de la situation physiologique.

Le cyclofène cagé nous donne beaucoup de perspectives telles que l'étude de lignage, de développement et de cancérogénèse. L'utilisation du groupement protecteur thiocoumarine offre encore plus d'avantages grâce à son absorption dans le bleu. Combiné avec la microscopie bi-photonique, cette molécule permet d'activer ou d'inactiver une protéine avec une très grande résolution spatio-temporelle sans les agresser

# Article 1

Spatiotemporal manipulation of retinoic acid activity in zebrafish hindbrain development via  
photo-isomerization.



## Article 2

A Blue-Absorbing Photolabile Protecting Group for in vivo Chromatically Orthogonal  
Photoactivation

## Bibliographie

- [1] A. Urasaki, K. Asakawa, K. Kawakami, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 19827–19832.
- [2] K. Kawakami, *Genome Biology* **2007**, *8*, DOI Artn S7 Doi 10.1186/Gb-2007-8-S1-S7.
- [3] S. Hans, J. Kaslin, D. Freudenreich, M. Brand, *Plos One* **2009**, *4*, DOI Artn E4640 Doi 10.1371/Journal.Pone.0004640.
- [4] R. T. Collins, C. Linker, J. Lewis, *Nature Methods* **2010**, *7*, 219–223.
- [5] E. Wienholds, F. van Eeden, M. Kusters, J. Mudde, R. H. A. Plasterk, E. Cuppen, *Genome Research* **2003**, *13*, 2700–2707.
- [6] H. M. Stern, L. I. Zon, *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 533–539.
- [7] A. Nasevicius, S. C. Ekker, *Nature Genetics* **2000**, *26*, 216–220.
- [8] K. A. Urtishak, M. Choob, X. B. Tian, N. Sternheim, W. S. Talbot, E. Wickstrom, S. A. Farber, *Developmental Dynamics* **2003**, *228*, 405–413.
- [9] J. Summerton, *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1999**, *1489*, 141–158.
- [10] B. R. Bill, A. M. Petzold, K. J. Clark, L. A. Schimmenti, S. C. Ekker, *Zebrafish* **2009**, *6*, 69–77.
- [11] T. Y. Choi, J. H. Kim, D. H. Ko, C. H. Kim, J. S. Hwang, S. Ahn, S. Y. Kim, C. D. Kim, J. H. Lee, T. J. Yoon, *Pigment Cell Research* **2007**, *20*, 120–127.
- [12] A. S. Flynt, N. Li, E. J. Thatcher, L. Solnica-Krezel, J. G. Patton, *Nature Genetics* **2007**, *39*, 259–263.
- [13] M. H. Porteus, D. Carroll, *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 967–973.
- [14] Y. Doyon, J. M. McCammon, J. C. Miller, F. Faraji, C. Ngo, G. E. Katibah, R. Amora, T. D. Hocking, L. Zhang, E. J. Rebar, et al., *Nature Biotechnology* **2008**, *26*, 702–708.
- [15] X. D. Meng, M. B. Noyes, L. H. J. Zhu, N. D. Lawson, S. A. Wolfe, *Nature Biotechnology* **2008**, *26*, 695–701.

- [16] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, *Developmental Dynamics* **1995**, *203*, 253–310.
- [17] J. Von Lintig, *Annual Review of Nutrition* **2010**, *30*, 35–56.
- [18] S. B. Wolbach, P. R. Howe, *Nutrition Reviews* **1978**, *36*, 16–19.
- [19] J. Corcoran, P. L. So, R. D. Barber, K. J. Vincent, N. D. Mazarakis, K. A. Mitrophanous, S. M. Kingsman, M. Maden, *Journal of Cell Science* **2002**, *115*, 3779–3786.
- [20] J. E. Dowling, G. Wald, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 648–661.
- [21] D. S. McLaren, *Nutrition* **2001**, *17*, 780–782.
- [22] A. Hussain, G. Kvale, M. Odland, *Bulletin of the World Health Organization* **1995**, *73*, 469–476.
- [23] C. Saunders, R. A. Ramalho, A. P. P. T. de Lima, M. M. Gomes, L. F. Campos, B. A. D. Silva, A. G. Soares, M. D. Leal, *Nutrition* **2005**, *21*, 456–461.
- [24] N. A. Palafox, M. V. Gamble, B. Dancheck, M. O. Ricks, K. Briand, R. D. Semba, *Nutrition* **2003**, *19*, 405–408.
- [25] S. Johansson, P. M. Lind, H. Hakansson, H. Oxlund, J. Orberg, H. Melhus, *Bone* **2002**, *31*, 685–689.
- [26] S. Hough, L. V. Avioli, H. Muir, D. Gelderblom, G. Jenkins, H. Kurasi, E. Slatopolsky, M. A. Bergfeld, S. L. Teitelbaum, *Endocrinology* **1988**, *122*, 2933–2939.
- [27] K. A. Marshall, R. J. Reiter, B. Poeggeler, O. I. Aruoma, B. Halliwell, *Free Radic Biol Med* **1996**, *21*, 307–315.
- [28] A. J. Durston, J. P. Timmermans, W. J. Hage, H. F. Hendriks, N. J. de Vries, M. Heideveld, P. D. Nieuwkoop, *Nature* **1989**, *340*, 140–144.
- [29] R. Blomhoff, *Nutrition Reviews* **1994**, *52*, 13–23.
- [30] H. K. Blomhoff, E. B. Smeland, B. Erikstein, A. M. Rasmussen, B. Skrede, C. Skjonsberg, R. Blomhoff, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 23988–23992.
- [31] M. M. Hussain, F. R. Maxfield, J. Masoliva, I. Tabas, Z. S. Ji, T. L. Innerarity, R. W. Mahley, *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 13936–13940.
- [32] A. V. Vieira, K. Kuchler, W. J. Schneider, *DNA and Cell Biology* **1995**, *14*, 403–410.

- [33] A. V. Vieira, W. J. Schneider, P. M. Vieira, *Journal of Endocrinology* **1995**, *146*, 201–207.
- [34] D. Bellovino, M. Apreda, S. Gragnoli, M. Massimi, S. Gaetani, *Mol Aspects Med* **2003**, *24*, 411–420.
- [35] E. H. Harrison, M. M. Hussain, *Journal of Nutrition* **2002**, *132*, 1405–1408.
- [36] A. C. Chen, K. Yu, M. A. Lane, L. J. Gudas, *Arch Biochem Biophys* **2003**, *411*, 159–173.
- [37] P. M. Petkovich, *Journal of the American Academy of Dermatology* **2001**, *45*, S136–S142.
- [38] R. Kawaguchi, J. M. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. P. Ping, P. Wiita, D. Bok, H. Sun, *Science* **2007**, *315*, 820–825.
- [39] A. Molotkov, L. Deltour, M. H. Foglio, A. E. Cuenca, G. Duester, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 13804–13811.
- [40] L. L. Sandell, B. W. Sanderson, G. Moiseyev, T. Johnson, A. Mushegian, K. Young, J. P. Rey, J. X. Ma, K. Staehling-Hampton, P. A. Trainor, *Genes & Development* **2007**, *21*, 1113–1124.
- [41] V. Dupe, N. Matt, J. M. Garnier, P. Chambon, M. Mark, N. B. Ghyselinck, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 14036–14041.
- [42] K. Niederreither, J. Vermot, N. Messaddeq, B. Schuhbauer, P. Chambon, P. Dolle, *Development* **2001**, *128*, 1019–1031.
- [43] K. Niederreither, V. Subbarayan, P. Dolle, P. Chambon, *Nat Genet* **1999**, *21*, 444–448.
- [44] V. Ribes, Z. X. Wang, P. Dolle, K. Niederreither, *Development* **2006**, *133*, 351–361.
- [45] K. Niederreither, V. Fraulob, J. M. Garnier, P. Chambon, P. Dolle, *Mech Dev* **2002**, *110*, 165–171.
- [46] I. O. Sirbu, G. Duester, *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 271–277.
- [47] N. Matt, V. Dupe, J. M. Garnier, C. Dennefeld, P. Chambon, M. Mark, N. B. Ghyselinck, *Development* **2005**, *132*, 4789–4800.
- [48] A. Molotkov, N. Molotkova, G. Duester, *Development* **2006**, *133*, 1901–1910.

- [49] R. Suzuki, T. Shintani, H. Sakuta, A. Kato, T. Ohkawara, N. Osumi, M. Noda, *Mechanisms of Development* **2000**, *98*, 37–50.
- [50] V. Ribes, D. M. E. Otto, L. Dickmann, K. Schmidt, B. Schuhbaur, C. Henderson, R. Blomhoff, C. R. Wolf, C. Tickle, P. Dolle, *Developmental Biology* **2007**, *303*, 66–81.
- [51] D. J. Mangelsdorf, *Nutrition Reviews* **1994**, *52*, 32–44.
- [52] P. Chambon, *FASEB J* **1996**, *10*, 940–954.
- [53] P. Kastner, J. M. Grondona, M. Mark, A. Gansmuller, M. Lemeur, D. Decimo, J. L. Vonesch, P. Dolle, P. Chambon, *Cell* **1994**, *78*, 987–1003.
- [54] S. Nagpal, M. Saunders, P. Kastner, B. Durand, H. Nakshatri, P. Chambon, *Cell* **1992**, *70*, 1007–1019.
- [55] S. Nagpal, S. Friant, H. Nakshatri, P. Chambon, *Embo Journal* **1993**, *12*, 2349–2360.
- [56] V. Chandra, P. X. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. J. Wang, T. P. Burris, F. Rastinejad, *Nature* **2008**, *456*, 350–U33.
- [57] J. E. Driscoll, C. L. Seachord, J. A. Lupisella, R. P. Darveau, P. R. Reczek, *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 22969–22975.
- [58] M. E. Torres-Padilla, F. M. Sladek, M. C. Weiss, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 44677–44687.
- [59] A. Warnmark, E. Treuter, A. P. H. Wright, J. A. Gustafsson, *Molecular Endocrinology* **2003**, *17*, 1901–1909.
- [60] M. Leid, P. Kastner, P. Chambon, *Trends Biochem Sci* **1992**, *17*, 427–433.
- [61] X. H. Leng, J. Blanco, S. Y. Tsai, K. Ozato, B. W. Omalley, M. J. Tsai, *Molecular and Cellular Biology* **1995**, *15*, 255–263.
- [62] D. Picard, K. R. Yamamoto, *EMBO J* **1987**, *6*, 3333–3340.
- [63] R. Taneja, C. Rochette-Egly, J. L. Plassat, L. Penna, M. P. Gaub, P. Chambon, *EMBO J* **1997**, *16*, 6452–6465.
- [64] B. F. Tate, G. Allenby, J. R. Perez, A. A. Levin, J. F. Grippo, *FASEB J* **1996**, *10*, 1524–1531.
- [65] J. Bastien, C. Rochette-Egly, *Gene* **2004**, *328*, 1–16.
- [66] C. K. Glass, *J Endocrinol* **1996**, *150*, 349–357.

- [67] A. Cvekl, W. L. Wang, *Exp Eye Res* **2009**, *89*, 280–291.
- [68] S. Mader, J. Y. Chen, Z. Chen, J. White, P. Chambon, H. Gronemeyer, *EMBO J* **1993**, *12*, 5029–5041.
- [69] D. J. Mangelsdorf, R. M. Evans, *Cell* **1995**, *83*, 841–850.
- [70] B. Blumberg, R. M. Evans, *Genes Dev* **1998**, *12*, 3149–3155.
- [71] B. M. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, R. M. Evans, *Cell* **1995**, *83*, 803–812.
- [72] L. Altucci, H. Gronemeyer, *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 181–193.
- [73] H. Marshall, S. Nonchev, M. H. Sham, I. Muchamore, A. Lumsden, R. Krumlauf, *Nature* **1992**, *360*, 737–741.
- [74] J. C. Glover, X. Lampe, F. M. Rijli, **2006**, *16*, DOI 10.1016/S1574-3349(06)16005-6.
- [75] M. Maden, P. Hunt, U. Eriksson, A. Kuroiwa, R. Krumlauf, D. Summerbell, *Development* **1991**, *111*, 35–43.
- [76] G. M. Morriss, *J Anat* **1972**, *113*, 241–250.
- [77] A. J. Durston, J. P. M. Timmermans, W. J. Hage, H. F. J. Hendriks, N. J. Devries, M. Heideveld, P. D. Nieuwkoop, *Nature* **1989**, *340*, 140–144.
- [78] N. Holder, J. Hill, *Development* **1991**, *113*, 1159–&.
- [79] H. Wood, G. Pall, G. Morriss-Kay, *Development* **1994**, *120*, 2279–2285.
- [80] E. Gale, M. Zile, M. Maden, *Mech Dev* **1999**, *89*, 43–54.
- [81] J. C. White, M. Highland, M. Kaiser, M. Clagett-Dame, *Dev Biol* **2000**, *220*, 263–284.
- [82] H. Wood, G. Pall, G. Morriss-Kay, *Development (Cambridge, England)* **1994**, *120*, 2279–85.
- [83] G. M. Morriss-Kay, P. Murphy, R. E. Hill, D. R. Davidson, *the The European Molecular Biology Organization Journal* **1991**, *10*, 2985–2995.
- [84] N. Papalopulu, J. D. W. Clarke, L. Bradley, D. Wilkinson, R. Krumlauf, N. Holder, *Development* **1991**, *113*, 1145–&.

- [85] Z. Zhang, J. E. Balmer, A. Lovlie, S. H. Fromm, R. Blomhoff, *Developmental Dynamics An Official Publication of the American Association of Anatomists* **1996**, 206, 73–86.
- [86] J. C. Kraft, C. C. Willhite, M. R. Juchau, *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* **1994**, 14, 75–86.
- [87] R. Nittenberg, K. Patel, Y. Joshi, R. Krumlauf, D. G. Wilkinson, P. M. Brickell, C. Tickle, J. D. Clarke, *Development* **1997**, 124, 2297–2306.
- [88] A. Perz-Edwards, N. L. Hardison, E. Linney, *Developmental Biology* **2001**, 229, 89–101.
- [89] C. M. Colbert, W. B. Levy, *Brain Res* **1993**, 606, 87–91.
- [90] Y. Chen, L. Huang, M. Solursh, *Developmental Biology* **1994**, 161, 70–76.
- [91] P. McCaffery, U. C. Dräger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 7194–7197.
- [92] K. Niederreither, P. McCaffery, U. C. Dräger, P. Chambon, P. Dolle, *Mech Dev* **1997**, 62, 67–78.
- [93] K. Berggren, P. McCaffery, U. Dräger, C. J. Forehand, *Developmental Biology* **1999**, 210, 288–304.
- [94] G. Begemann, T. F. Schilling, G. J. Rauch, R. Geisler, P. W. Ingham, *Development Cambridge England* **2001**, 128, 3081–3094.
- [95] R. J. Haselbeck, I. Hoffmann, G. Duester, *Dev Genet* **1999**, 25, 353–364.
- [96] K. Niederreither, J. Vermot, B. Schuhbaur, P. Chambon, P. Dollé, *Development Cambridge England* **2000**, 127, 75–85.
- [97] G. Begemann, T. F. Schilling, G. J. Rauch, R. Geisler, P. W. Ingham, *Development* **2001**, 128, 3081–3094.
- [98] J. A. White, B. Beckett-Jones, Y. D. Guo, F. J. Dilworth, J. Bonasoro, G. Jones, M. Petkovich, *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 18538–18541.
- [99] W. J. Ray, G. Bain, M. Yao, D. I. Gottlieb, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 18702–18708.
- [100] K. Fujii, *Drug Metabolism and Drug Interactions* **1997**, 14, 99–107.
- [101] T. Hollemann, Y. L. Chen, H. Grunz, T. Pieler, *Embo Journal* **1998**, 17, 7361–7372.

- [102] K. De Roos, E. Sonneveld, B. Compaan, D. Ten Berge, A. J. Durston, P. T. Van Der Saag, *Mechanisms of Development* **1999**, *82*, 205–211.
- [103] S. Abu-Abed, P. Dolle, D. Metzger, B. Beckett, P. Chambon, M. Petkovich, *Genes Dev* **2001**, *15*, 226–240.
- [104] A. K. Sakai, F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen, N. C. Ellstrand, et al., *Annual Review of Ecology and Systematics* **2001**, *32*, 305–332.
- [105] T. Kudoh, S. W. Wilson, I. B. Dawid, *Development* **2002**, *129*, 4335–4346.
- [106] K. Emoto, H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, M. Umeda, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 37901–37907.
- [107] I. O. Sirbu, L. Gresh, J. Barra, G. Dueter, *Developmental Biology* **2005**, *283*, 623.
- [108] R. E. Hernandez, A. P. Putzke, J. P. Myers, L. Margaretha, C. B. Moens, *Development (Cambridge, England)* **2007**, *134*, 177–87.
- [109] R. J. White, Q. Nie, A. D. Lander, T. F. Schilling, *PLoS biology* **2007**, *5*, e304.
- [110] Y. Zhao, E. Samal, D. Srivastava, *Circulation* **2005**, *112*, U107–U107.
- [111] S. Reijntjes, E. Gale, M. Maden, *Gene Expression Patterns* **2003**, *3*, 621–627.
- [112] G. MacLean, S. Abu-Abed, P. Dolle, A. Tahayato, P. Chambon, M. Petkovich, *Mechanisms of Development* **2001**, *107*, 195–201.
- [113] S. Reijntjes, E. Gale, M. Maden, *Developmental Dynamics* **2004**, *230*, 509–517.
- [114] M. Uehara, K. Yashiro, S. Mamiya, J. Nishino, P. Chambon, P. Dolle, Y. Sakai, *Dev Biol* **2007**, *302*, 399–411.
- [115] A. Tahayato, R. Sonnevile, F. Pichaud, M. F. Wernet, D. Papatsenko, P. Beaufils, T. Cook, C. Desplan, *Developmental Cell* **2003**, *5*, 391–402.
- [116] M. Parisotto, H. Brodeur, P. V. Bhat, S. Mader, *Med Sci (Paris)* **2006**, *22*, 1101–1106.
- [117] G. Siegenthaler, I. Tomatis, L. Didierjean, S. Jaconi, J. H. Saurat, *Dermatology Basel Switzerland* **1992**, *185*, 251–256.
- [118] L. Delva, J. N. Bastie, C. Rochette-Egly, R. Kraiba, N. Balitrand, G. Despouy, P. Chambon, C. Chomienne, *Mol Cell Biol* **1999**, *19*, 7158–7167.
- [119] A. S. Budhu, N. Noy, *Molecular and Cellular Biology* **2002**, *22*, 2632–2641.



- [120] J. F. Boylan, L. J. Gudas, *J Cell Biol* **1991**, *112*, 965–979.
- [121] J. F. Boylan, L. J. Gudas, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 21486–21491.
- [122] P. D. Fiorella, J. L. Napoli, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 10538–10544.
- [123] S. Pfoertner, U. Goelden, W. Hansen, T. Toepfer, R. Geffers, S. N. Ukena, R. von Knobloch, R. Hofmann, J. Buer, A. J. Schrader, *Tumour Biol* **2005**, *26*, 313–323.
- [124] M. A. Blaese, L. Santo-Hoeltje, H. P. Rodemann, *Int J Radiat Biol* **2003**, *79*, 981–991.
- [125] X. H. Tang, M. Vivero, L. J. Gudas, *Exp Cell Res* **2008**, *314*, 38–51.
- [126] J. L. Napoli, K. P. Posch, P. D. Fiorella, M. H. Boerman, *Biomed Pharmacother* **1991**, *45*, 131–143.
- [127] P. D. Fiorella, J. L. Napoli, *J Biol Chem* **1991**, *266*, 16572–16579.
- [128] P. D. Fiorella, J. L. Napoli, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 10538–10544.
- [129] D. Dong, S. E. Ruuska, D. J. Levinthal, N. Noy, *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 23695–23698.
- [130] R. J. Sessler, N. Noy, *Molecular Cell* **2005**, *18*, 343–353.
- [131] C. Lampron, C. Rochette-Egly, P. Gorry, P. Dollé, M. Mark, T. Lufkin, M. LeMeur, P. Chambon, *Development Cambridge England* **1995**, *121*, 539–548.
- [132] E. C. Swindell, C. Thaller, S. Sockanathan, M. Petkovich, T. M. Jessell, G. Eichele, *Developmental Biology* **1999**, *216*, 282–296.
- [133] G. Begemann, M. Marx, K. Mebus, A. Meyer, M. Bastmeyer, *Dev Biol* **2004**, *271*, 119–129.
- [134] L. Maves, C. B. Kimmel, *Dev Biol* **2005**, *285*, 593–605.
- [135] C. Bochet, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6341–6346.
- [136] P. Neveu, I. Aujard, C. Benbrahim, T. Le Saux, J.-F. Allemand, S. Vrizz, D. Bensimon, L. Jullien, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2008**, *47*, 3744–6.
- [137] X. Zhao, K. Palczewski, H. Ohguro, *Biophysical Chemistry* **1995**, *56*, 183–188.
- [138] T. Ebrey, Y. Koutalos, *Progress in Retinal and Eye Research* **2001**, *20*, 49–94.
- [139] K. Palczewski, *Annual Review of Biochemistry* **2006**, *75*, 743–767.

- [140] A. B. Barua, H. C. Furr, *Molecular Biotechnology* **1998**, *10*, 3–28.
- [141] G. Allenby, M. T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J. F. Grippo, P. Chambon, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 30–34.
- [142] R. A. Heyman, D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, R. B. Stein, G. Eichele, R. M. Evans, C. Thaller, *Cell* **1992**, *68*, 397–406.
- [143] C. Calléja, N. Messaddeq, B. Chapellier, H. Yang, W. Krezel, M. Li, D. Metzger, B. Mascrez, K. Ohta, H. Kagechika, et al., *Genes & Development* **2006**, *20*, 1525–1538.
- [144] G. Wolf, *Nutr Rev* **2006**, *64*, 532–538.
- [145] M. a Kane, *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1821*, 10–20.
- [146] P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R. M. Evans, M. A. Lazar, M. Leid, A. R. De Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf, H. Gronemeyer, *Pharmacol Rev* **2006**, *58*, 760–772.
- [147] M. Gianní, A. Tarrade, E. A. Nigro, E. Garattini, C. Rochette-Egly, *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 34458–34466.
- [148] P. Costaridis, C. Horton, J. Zeitlinger, N. Holder, M. Maden, *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists* **1996**, *205*, 41–51.
- [149] M. Maden, E. Sonneveld, P. T. Van Der Saag, E. Gale, *Development Cambridge England* **1998**, *125*, 4133–4144.
- [150] S. M. Ulven, T. E. Gundersen, A. K. Sakhi, J. C. Glover, R. Blomhoff, *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists* **2001**, *222*, 341–353.
- [151] F. Hoover, T. E. Gundersen, S. M. Ulven, J. J. Michaille, S. Blanchet, R. Blomhoff, J. C. Glover, *Journal of Comparative Neurology* **2001**, *436*, 324–335.
- [152] L. Solomin, C. B. Johansson, R. H. Zetterström, R. P. Bissonnette, R. A. Heyman, L. Olson, U. Lendahl, J. Frisén, T. Perlmann, *Nature* **1998**, *395*, 398–402.
- [153] A. Luria, J. D. Furlow, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 8987–92.
- [154] J. T. Goldstein, A. Dobrzyn, M. Clagett-Dame, J. W. Pike, H. F. DeLuca, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, *420*, 185–193.
- [155] T. Matkovits, S. Christakos, *Molecular endocrinology Baltimore Md* **1995**, *9*, 232–242.

- [156] K. O'Reilly, S. J. Bailey, M. A. Lane, *Experimental biology and medicine Maywood NJ* **2010**, *233*, 251–258.
- [157] M. Tsukada, M. Schröder, T. C. Roos, R. A. Chandraratna, U. Reichert, H. F. Merk, C. E. Orfanos, C. C. Zouboulis, *The Journal of investigative dermatology* **2000**, *115*, 321–327.
- [158] J. L. Armstrong, M. Ruiz, A. V. Boddy, C. P. F. Redfern, A. D. J. Pearson, G. J. Veal, *British Journal of Cancer* **2005**, *92*, 696–704.
- [159] K. Herrmann, *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA* **1995**, *9*, 267–283.
- [160] D. G. Wilkinson, S. Bhatt, P. Chavrier, R. Bravo, P. Charnay, *Nature* **1989**, *337*, 461–464.
- [161] S. Schneider-Maunoury, T. Seitanidou, P. Charnay, A. Lumsden, *Development* **1997**, *124*, 1215–1226.
- [162] P. J. Swiatek, T. Gridley, *Genes Dev* **1993**, *7*, 2071–2084.
- [163] C. B. Moens, Y. L. Yan, B. Appel, A. G. Force, C. B. Kimmel, *Development* **1996**, *122*, 3981–3990.
- [164] M. Manzanares, S. Cordes, L. Ariza-McNaughton, V. Sadl, K. Maruthainar, G. Barsh, R. Krumlauf, *Development* **1999**, *126*, 759–769.
- [165] M. Manzanares, S. Bel-Vialar, L. Ariza-McNaughton, E. Ferretti, H. Marshall, M. M. Maconochie, F. Blasi, R. Krumlauf, *Development* **2001**, *128*, 3595–3607.
- [166] Z. Sun, N. Hopkins, *Genes Dev* **2001**, *15*, 3217–3229.
- [167] D. Chomette, M. Frain, S. Cereghini, P. Charnay, J. Ghislain, *Development* **2006**, *133*, 1253–1262.
- [168] M. Pouilhe, P. Gilardi-Hebenstreit, C. Desmarquet-Trin Dinh, P. Charnay, *Dev Biol* **2007**, *309*, 344–357.
- [169] D. K. Sinha, P. Neveu, N. Gagey, I. Aujard, C. Benbrahim-Bouzidi, T. Le Saux, C. Rampon, C. Gauron, B. Goetz, S. Dubruille, et al., *Chembiochem A European Journal Of Chemical Biology* **2010**, *11*, 653–663.
- [170] D. K. Sinha, P. Neveu, N. Gagey, I. Aujard, T. Le Saux, C. Rampon, C. Gauron, K. Kawakami, C. Leucht, L. Bally-Cuif, et al., *Zebrafish* **2010**, *7*, 199–204.

[171] J. Meyer, K. Baier, J. Wilbert, M. Guckenberger, A. Richter, M. Flentje, *Acta oncologica Stockholm Sweden* **2006**, *45*, 923–934.