

The 3rd French-British Meeting on Nutrition, a joint meeting of the Nutrition Society, Association Française de Nutrition and Société de Nutrition et Diététique de la Langue Française was held at Nancy, France on 30 September – 2 October 1998

Symposium on 'Functionality of nutrients and gene expression'

A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse

Manuel Mark, Norbert B. Ghyselinck, Olivia Wendling, Valérie Dupé, Bénédicte Mascrez, Philippe Kastner and Pierre Chambon*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, BP 163, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France

To determine the functions of retinoic acid receptors RAR and RXR, we have systematically knocked-out their genes by homologous recombination in the embryonic stem cells and generated null-mutant mice. This approach has allowed us to perform a genetic dissection of the retinoic acid signalling pathway.

Résumé

Il y a plus d'un demi siècle, le groupe de J Warkany (Wilson *et al.* 1953) démontrait que les foetus de rattes carencées en vitamine A (ou rétinol) présentent un ensemble d'anomalies affectant l'oeil, le diaphragme, les systèmes respiratoire et urogénital, le myocarde et les voies d'éjection du coeur. Les effets tératogènes de doses pharmacologiques d'acide rétinoïque (AR) ont, par ailleurs, suggéré qu'il agirait en tant que morphogène conférant aux cellules une information de position nécessaire à la mise en place de l'axe antéro-postérieur du corps et des membres. Les effets délétères de la carence en vitamine A chez le rat après la naissance ont montré qu'elle était aussi essentielle à la croissance, à la survie, à la reproduction, à la vision, ainsi qu'au maintien de l'état différencié normal de nombreux tissus. En effet, la métaplasie malpighienne d'épithéliums divers, la kératinisation de la cornée et de la conjonctive, la dégénérescence des tubes seminifères et des photorécepteurs rétiniens sont pathognomoniques de la carence post-natale en vitamine A. Chez l'adulte, l'AR peut à la fois prévenir et guérir les troubles dus à une alimentation carencée en vitamine A, exception faite de la perte de la vision nocturne et de la dégénérescence rétinienne. Il représente donc, avec le rétinaldéhyde, qui est impliqué dans le cycle visuel, un rétinolide actif majeur. La preuve directe que l'AR peut remplacer la vitamine A à certaines étapes de l'embryogenèse n'a été apportée que très récemment. L'AR agit par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand qui appartiennent à deux familles: les RAR activés par l'AR tout-*trans* et 9-*cis* (les deux isomères naturels majeurs de l'AR), et les RXR activés uniquement par l'AR 9-*cis*. Chaque famille se compose de trois isotypes génétiques (RAR ou RXR α , β et γ). *In vitro*, la transactivation des gènes cibles de l'AR fait, en règle générale, intervenir des hétérodimères RAR/RXR. La voie de signalisation par l'AR est compliquée du fait que les RXR sont des partenaires d'hétérodimérisation, éventuellement 'silencieux' (i.e. non activables par leur ligand), d'autres récepteurs nucléaires incluant les récepteurs de la triiodothyronine, le récepteur de la 1,25-dihydroxycholecalciferol, les récepteurs activés par les proliférateurs de péroxisomes (PPAR; dont les ligands physiologiques sont des dérivés d'acides gras) ainsi que de nombreux récepteurs orphelins (i.e. dont aucun ligand n'est connu). Dans le but de déterminer les fonctions des RAR et des RXR *in vivo*, notre groupe a inactivé systématiquement leurs gènes par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires de souris, et engendré des mutants 'nuls' n'exprimant plus un type donné de récepteur. Cette approche a permis de réaliser une véritable 'dissection génétique' de la voie de signalisation de l'AR. Les mutants nuls pour RAR α , β et γ sont viables. Pris dans leur ensemble, ils reproduisent la plupart des manifestations du syndrome de carence post-natale en vitamine A,

Abbreviations: CRABP, cellular retinoic acid-binding proteins; RA, retinoic acid; RAR, retinoic acid receptor activated by all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid; RXR, retinoic acid receptor activated by 9-*cis* retinoic acid only; VAD, vitamin A-deficient.

***Corresponding author:** Professor Pierre Chambon, fax +33 38865 3203, email chambon@igbmc.u-strasbg.fr

mais leurs anomalies sont confinées à un petit nombre des tissus exprimant ces gènes chez l'animal normal. L'existence d'une redondance fonctionnelle entre RAR est confortée par le fait que les mutants n'exprimant plus un couple d'isotypes (mutants RAR α /RAR β , RAR α /RAR γ et RAR β /RAR γ) meurent *in utero* ou à la naissance et, pris dans leur ensemble, présentent l'intégralité du syndrome de carence foetale en vitamine A. Les mutants nuls pour les RAR présentent également de très nombreuses anomalies qui n'avaient pas été détectées chez des foetus déficients en vitamine A, les états carenciels profonds étant incompatibles avec la gestation. Certaines de ces anomalies additionnelles ont été reproduites chez des embryons de souris en culture, soit en injectant dans la vésicule vitelline des oligonucléotides antisens pour la retinobinding protein, soit en ajoutant au milieu de culture un antagoniste de l'AR. D'une façon générale, l'analyse des mutants nuls pour les RAR indique que l'AR est effectivement le métabolite actif de la vitamine A au cours du développement et qu'il participe à l'organogenèse de nombreux systèmes, ainsi qu'à plusieurs étapes du développement d'un même organe. Les RAR, et par conséquent l'AR, sont notamment indispensables à l'ontogenèse des dérivés mésenchymateux de la crête neurale. Ils sont impliqués dans l'établissement des patterns le long de l'axe antéro-postérieur du corps en contrôlant directement l'expression de certains gènes *Hox*, ainsi que dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur des membres. Ils interviennent par ailleurs dans l'histogenèse de la rétine, la différenciation des cardiomyocytes, ainsi que dans le contrôle de l'apoptose dans la rétine, dans le mésenchyme fronto-nasal et interdigital et dans le septum conotruncal. L'interprétation des phénotypes des souris nulles pour les RXR est éventuellement plus délicate, dans la mesure où les RXR sont des partenaires d'hétérodimérisation potentiels d'autres récepteurs nucléaires. Par exemple, les souris mâles RXR $\beta^{-/-}$ sont stériles en raison d'une spermiogenèse défectueuse, vraisemblablement secondaire à une surcharge lipidique des cellules de Sertoli. Ce phénotype pourrait refléter l'intervention de RXR β comme partenaire d'hétérodimérisation de PPAR β , un récepteur nucléaire fortement exprimé par les cellules de Sertoli et impliqué dans la régulation du catabolisme lipidique. Les mutants nuls pour RXR γ sont morphologiquement normaux. Cependant, les doubles mutants nuls RXR γ /RAR β et RXR β /RAR β présentent des troubles locomoteurs corrélés à une diminution de l'expression des récepteurs de la dopamine dans le striatum. Les mutants nuls pour RXR α meurent *in utero* pendant la période foetale et présentent des hypoplasies du myocarde ventriculaire, des communications interventriculaires membraneuses, ainsi que diverses malformations oculaires. Des défauts de l'histogenèse du placenta sont également observés. Des anomalies identiques sont présentes chez certains double-mutants nuls pour les RAR, ainsi que chez les foetus carencés en vitamine A. La ressemblance de ces phénotypes suggère que RXR α agit en tant que composant d'hétérodimères RXR α /RAR activés par l'AR. L'importance de RXR α pour le développement embryonnaire et placentaire, révélée par l'analyse des mutants RXR $\alpha^{-/-}$, est sous-évaluée en raison d'une redondance fonctionnelle partielle avec RXR β : en effet, les doubles mutants nuls RXR α /RXR β meurent tous au cours du développement embryonnaire précoce et présentent des malformations très sévères, ainsi qu'une agénésie du placenta. L'analyse morphologique de souris déficientes à la fois en RAR et RXR indique une convergence des voies de signalisation relayées d'une part par RXR α , et d'autre part par RAR α , RAR β ou RAR γ . La preuve en est que des anomalies nouvelles, absentes chez les mutants simples, apparaissent chez les double-mutants nuls RXR α /RAR α , RXR α /RAR β et RXR α /RAR γ . En d'autres termes, l'analyse du phénotype des mutants RXR α /RAR révèle que la possibilité d'une compensation fonctionnelle par les RAR restants devient problématique en cas d'absence du partenaire RXR d'hétérodimérisation préférentiel. Toutes ces nouvelles anomalies sont également présentes chez des double-mutants nuls pour les RAR (RAR/RAR) et la plupart ont été décrites chez des foetus carencés en vitamine A. Cette concordance de phénotypes additionnée (1) à l'absence d'anomalie morphologique chez les double-mutants nuls RXR β /RXR γ , (2) à l'absence de synergie entre les mutations nulles pour RXR β ou RXR γ et les inactivations de RAR (α , β ou γ) permettent de conclure que les unités fonctionnelles principales de la voie de signalisation de l'AR au cours du développement embryonnaire sont des hétérodimères RXR α /RAR. Deux protéines cytoplasmiques se liant à l'AR tout-*trans*, cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP) I et II, pourraient intervenir dans le stockage, le transport vers le noyau et/ou la dégradation de l'AR et ainsi contrôler la concentration intracellulaire d'AR libre, disponible pour activer les récepteurs nucléaires. Néanmoins, contrairement aux RAR et aux RXR, les CRABP ne sont pas indispensables au développement, puisque les double-mutants nuls CRABPI/CRABPII sont quasi-normaux.

**Retinoic acid receptors: Retinoic acid-binding protein:
Retinoic acid signalling pathway**

Vitamin A deficiency syndromes demonstrate that this molecule is indispensable for embryonic development and postnatal life

Hale, in a series of publications that he initiated in 1933, showed that deficiency in a nutritional factor, which happened to be vitamin A (retinol), could induce congenital malformations in pigs, and ruled out the possibility that genetic factors were responsible for the malformations observed (Hale, 1937). Hale's work is recognized to be the first controlled and, as it turned out, successful attempt to produce congenital malformations in mammals and, in this respect, also represents the first demonstration that, in a mammalian embryo, environmental factors could influence developmental processes as effectively as hereditary forces (for review, see Kalter & Warkany, 1959). Following this pioneering work, the group of J Warkany (for review, see Wilson *et al.* 1953) showed, half a century ago, that conceptuses of vitamin A-deficient (VAD) rat dams exhibit a large number of congenital abnormalities affecting the eyes, myocardium and aorticopulmonary septum, diaphragm, as well as respiratory and uro-genital systems. VAD studies have also shown that this vitamin is indispensable throughout postnatal development and adult life for survival, growth, reproduction, vision and maintenance of numerous tissues. Widespread squamous metaplasia of various epithelia, degeneration of seminiferous tubules and photoreceptors, are hallmarks of the postnatal VAD syndrome (for references, see Kastner *et al.* 1995; Mark & Chambon, 1997).

Retinoic acid is an active metabolite of vitamin A

In adult animals, retinoic acid (RA) can both prevent and eliminate the defects caused by a VAD diet, with the exceptions of night-blindness and retinal degeneration. Thus, RA represents, together with retinaldehyde which is involved in the visual cycle, a major bioactive retinoid (for review, see Kastner *et al.* 1995; Mark & Chambon, 1997). Direct evidence that RA could replace vitamin A at certain stages of embryogenesis was provided very recently (Dickman *et al.* 1997). Moreover, the teratogenic effects of pharmacological doses of RA have popularized the belief that it may act as a morphogen, providing positional information for the patterning of the limb and main body axes (for references, see Kastner *et al.* 1995; Mark & Chambon, 1997).

Nuclear receptors transduce the retinoid signal

The actions of RA are mediated by nuclear receptors which are ligand-inducible transcriptional regulators, and belong to two distinct families: RAR activated by all-*trans* and 9-*cis* RA (the two major natural RA isomers) and RXR activated by 9-*cis* RA only. Each family consists of three genetic isotypes (RAR- or RXR α , β and γ). The complexity of retinoid signalling pathways is increased by the fact that, at least *in vitro*, RAR bind to their cognate response elements as heterodimers with RXR. Moreover, RXR, which can also

bind *in vitro* to certain DNA response elements as homodimers, are heterodimerization partners for a number of nuclear receptors, such as thyroid hormone receptors, the cholecalciferol receptor, peroxisomal proliferator-activated receptors (which are activated by fatty acid derivatives), and numerous 'orphan' nuclear receptors (i.e. whose ligands, if any, remain to be discovered; for reviews, see Chambon, 1994, 1996).

Mutant mice lacking RAR α , RAR β or RAR γ are viable. Taken together, they display many aspects of the postnatal VAD syndrome, i.e. testicular degeneration (RAR α null mutants), squamous metaplasia of the male genital tract (RAR γ null mutants) and growth deficiency (RAR α , β and γ mutants; Lohnes *et al.* 1993; Lufkin *et al.* 1993; Ghyselinck *et al.* 1997). RAR β null mutants also display a persistent hyperplastic primary vitreous body, an ocular defect representing the most frequent malformation of the fetal VAD syndrome (Ghyselinck *et al.* 1997). However, the phenotypes of these RAR α , β and γ single-null mutant mice are confined to a small subset of the tissues normally expressing each of these receptors. The existence of a functional redundancy between RAR (see Kastner *et al.* 1995, 1997a; Mark *et al.* 1997; Mascrez *et al.* 1998) is confirmed by the fact that mutants lacking a pair of isotypes (RAR α /RAR β , RAR α /RAR γ and RAR β /RAR γ mutants) die *in utero* or at birth and display the spectrum of VAD-induced malformations (Lohnes *et al.* 1994; Mendelsohn *et al.* 1994; Ghyselinck *et al.* 1997; Subbarayan *et al.* 1997).

RAR single- and double-null mutants also exhibit abnormalities that have not been described in the fetal VAD syndrome, which can be explained readily by the difficulty in achieving, by dietary deprivation, a state of VAD which would remain compatible with pregnancy. Some of these additional abnormalities can be produced in cultured mouse embryos either by injecting anti-sense oligonucleotides to retinol-binding protein into the yolk-sac cavity (Båvik *et al.* 1996) or by supplementing the medium with an RA antagonist (O Wendling, P Chambon and M Mark, unpublished results). The overall analysis of RAR null mutants demonstrates that RAR, and therefore RA, play crucial roles at many distinct stages of the development of numerous organs (for review, see Kastner *et al.* 1995; Mark & Chambon, 1997). RAR are notably indispensable for the ontogenesis of (almost) all derivatives of the neural crest (for review, see Mark *et al.* 1995, 1998). They are involved in patterning of the antero-posterior body axis (Lohnes *et al.* 1993, 1994; Ghyselinck *et al.* 1997) through regulating the expression of certain *Hox* genes (for example, see Dupé *et al.* 1997), as well as in the establishment of the antero-posterior axis of the limb (Lohnes *et al.* 1994; Mascrez *et al.* 1998; Dupé *et al.* 1999). They are required for retinal histogenesis (Grondona *et al.* 1996) and cardiomyocyte differentiation (Kastner *et al.* 1994, 1997b), as well as for the control of apoptosis in the retina (Grondona *et al.* 1996), the fronto-nasal and interdigital mesenchymes (Lohnes *et al.* 1994; Ghyselinck *et al.* 1997; Dupé *et al.* 1999) and conotruncal septum (Ghyselinck *et al.* 1998).

RXR α /RAR(α , β or γ) heterodimers represent the functional units of the retinoic acid signalling pathway during development

It is currently unclear whether all the molecular properties of RXR characterized *in vitro* are relevant for their physiological functions in the animal. In particular, the conditions under which these receptors act as 9-*cis*-RA-dependent transcriptional regulators are not known, nor is whether all the suggested heterodimeric combinations occur *in vivo*. The knock-outs of the three RXR isotypes in the mouse have provided insights into their physiological functions. RXR α null mutants display cardiac and ocular defects characteristic of the fetal VAD syndrome (Kastner *et al.* 1994). Compound mutants in which an RAR isotype (α , β or γ) null mutation is associated either with an RXR α null mutation, or with a mutation (RXR α AF2 $^{\circ}$) deleting the last helical α structure of the ligand-binding domain which therefore inactivates the ligand-inducible activation function of RXR α , together reproduce the abnormalities of the VAD syndrome, as well as most of those exhibited by RAR mutants (Kastner *et al.* 1994, 1997a; Mascrez *et al.* 1998). These observations strongly support the notion that RXR/RAR heterodimers are the functional units that transduce retinoid signals *in vivo*. Moreover, RXR α appears to be functionally the most important RXR during development, as RXR β /RXR γ double-null mutants develop normally (Krezel *et al.* 1996). This last conclusion is further supported by a lack of synergism during development between RAR (α , β , or γ) and RXR β or RXR γ inactivations (Kastner *et al.* 1997).

RXR are also involved in the control of behaviour, Sertoli cell function and placentation

In postnatal mice, RXR β /RAR β and RXR γ /RAR β heterodimers appear to mediate retinoid signals required for the function of the mesolimbic dopaminergic system (Krezel *et al.* 1998). On the other hand, the aberrant lipid metabolism in Sertoli cells of RXR β null mice suggests functional interactions between RXR β and the peroxisomal proliferator-activated receptor signalling pathway (Kastner *et al.* 1996). The abnormal placental histogenesis in RXR α null mutants (Sapin *et al.* 1997) and early embryonic death of RXR α /RXR β double mutants, which is caused by the absence of formation of the chorioallantoic placenta, indicate the existence of a signalling pathway mediated by these nuclear receptors which is essential for placentogenesis and probably requires their heterodimerization with the peroxisome proliferator-activated receptor γ (Wendling *et al.* 1999a,b).

Cytoplasmic retinoic acid-binding proteins are dispensable, at least in the protected environment of an animal facility

Cytosolic proteins binding all-*trans* RA with high affinity, cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP) I and II, might be involved in the storage, transport to the nucleus and/or degradation of RA, and thus control the intracellular concentration of free RA available for activating nuclear

receptors. However, in contrast to RAR and RXR, CRABP are not essential for development, since CRABPI/CRABPII double mutants are near normal (Lampron *et al.* 1995).

Acknowledgements

We thank B. Weber, C. Hummel, I. Tilly for excellent technical assistance. We also thank the secretarial staff for their help in the preparation of the manuscript. Our work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Hôpital Universitaire de Strasbourg, the Collège de France, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Ligue Nationale contre le Cancer, the Human Frontier Science Program, and Bristol Myers Squibb.

References

- Båvik C, Ward SJ & Chambon P (1996) Developmental abnormalities in cultured mouse embryos deprived of retinoic acid by inhibition of yolk-sac retinol binding protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 3110–3114.
- Chambon P (1994) The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Seminars in Cell Biology* **5**, 115–125.
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB Journal* **10**, 940–954.
- Dickman ED, Thaller C & Smith SM (1997) Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development* **124**, 3111–3121.
- Dupé V, Davenne M, Brocard J, Dollé P, Mark M, Dierich A, Chambon P & Rijli FM (1997) In vivo functional analysis of the *Hoxa-13'* retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**, 399–410.
- Dupé V, Ghyselinck NB, Thomazy V, Nagy L, Davies PJA, Chambon P & Mark M (1999) Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Developmental Biology* **208**, 30–43.
- Ghyselinck NB, Dupé V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, Chambon P & Mark M (1997) Role of retinoic acid receptor beta (RAR β) during mouse development. *International Journal of Developmental Biology* **41**, 425–447.
- Ghyselinck NB, Wendling O, Messaddeq N, Dierich A, Lampron C, Décimo D, Viville S, Chambon P & Mark M (1998) Contribution of retinoic acid receptor beta isoforms to the formation of the conotruncal septum of the embryonic heart. *Developmental Biology* **198**, 303–318.
- Grondona JM, Kastner P, Gansmuller A, Décimo D, Chambon P & Mark M (1996) Retinal dysplasia and degeneration in RAR β 2/RAR γ 2 compound mutant mice. *Development* **122**, 2173–2188.
- Hale F (1937) The relation of maternal vitamin A deficiency to microphthalmia in pigs. *Texas State Journal of Medicine* **33**, 228–232.
- Kalter H & Warkany J (1959) Experimental production of congenital malformations in mammals by metabolic procedure. *Physiological Review* **39**, 69–115.
- Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Décimo D, Vonesch JL, Dollé P & Chambon P (1994) Genetic analysis of RXR α developmental function: convergence of RXR and RAR signalling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987–1003.

- Kastner P, Mark M & Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859–869.
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck NB, Krezel W, Dupé V, Grondona JM & Chambon P (1997a) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* **124**, 313–326.
- Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Grondona JM, Décimo D, Krezel W, Dierich A & Chambon P (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice. *Genes and Development* **10**, 80–96.
- Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, Ghyselinck N & Chambon P (1997b) Vitamin A deficiency and mutations of RXR α , RXR β and RAR α lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development* **124**, 4749–4758.
- Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P & Chambon P (1996) RXR γ null mice are apparently normal and compound RXR α ^{+/−}/RXR β ^{+/−}/RXR γ ^{+/−} mutant mice are viable. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 9010–9014.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E & Chambon P (1998) Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* **279**, 863–867.
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M & Chambon P (1995) Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**, 539–548.
- Lohnes D, Kastner P, Dierich A, Mark M, LeMeur M & Chambon P (1993) Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643–658.
- Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dollé P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A & Chambon P (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (1). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**, 2723–2748.
- Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, LeMeur M & Chambon P (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 7225–7229.
- Mark M & Chambon P (1997) Récepteurs de l'acide rétinoïque et morphogénèse (Retinoic acid receptors and morphogenesis). *Annales de l'Institut Pasteur* **8**, 85–95.
- Mark M, Ghyselinck NB, Kastner P, Dupé V, Wendling O, Krezel W, Mascrez B & Chambon P (1998) Mesectoderm is a major target of retinoic acid action. *European Journal of Oral Science* **106**, Suppl.1, 24–31.
- Mark M, Kastner P, Ghyselinck NB, Krezel W, Dupé V & Chambon P (1997) Contrôle génétique du développement par l'acide rétinoïque (Genetic control of development by retinoic acid). *Comptes Rendus de la Société de Biologie* **191**, 77–90.
- Mark M, Lohnes D, Mendelsohn C, Dupé V, Vonesch JL, Kastner P, Rijli F, Bloch-Zupan A & Chambon P (1995) Roles of retinoic acid receptors and of *Hox* genes in the patterning of the teeth and of the jaw skeleton. *International Journal of Developmental Biology* **39**, 111–121.
- Mascrez B, Mark M, Dierich A, Ghyselinck NB, Kastner P & Chambon P (1998) The RXR α ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* **125**, 4691–4707.
- Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P & Mark M (1994) Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* **120**, 2749–2771.
- Sapin V, Dollé P, Hindelang C, Kastner P & Chambon P (1997) Defects of the chorioallantoic placenta in mouse RXR α null fetuses. *Developmental Biology* **191**, 29–41.
- Subbarayan V, Kastner P, Mark M, Dierich A, Gorry P & Chambon P (1997) Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR γ 1 and RAR γ 2 isoforms. *Mechanisms in Development* **66**, 131–142.
- Wendling O, Chambon P & Mark M (1999a) Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 547–551.
- Wendling O, Chambon P & Mark M (1999b) Un rôle essentiel des récepteurs des rétinoïdes au cours du développement embryonnaire précoce et de la placentogenèse (An essential role for retinoid receptors during early embryonic development and placentogenesis). *Médecine/Sciences* (In the Press).
- Wilson JG, Roth CB & Warkany J (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *American Journal of Anatomy* **92**, 189–217.

