



Article scientifique

Article

1996

Published version

Open Access

This is the published version of the publication, made available in accordance with the publisher's policy.

Le contrôle génétique du développement des membres

Herault, Yann; Duboule, Denis

How to cite

HERAULT, Yann, DUBOULE, Denis. Le contrôle génétique du développement des membres. In: Annales de génétique, 1996, vol. 39, n° 4, p. 222–232.

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:164913>

LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT DES MEMBRES

Y. HÉRAULT, D. DUBOULE

HÉRAULT Y., DUBOULE D. – Le contrôle génétique du développement des membres.
Ann Génét, 1996, **39**, n° 4, 222-232.

HÉRAULT Y., DUBOULE D. – The genetic control of limb development. (*In French*).
Ann Génét, 1996, **39**, n° 4, 222-232.

RÉSUMÉ : Les membres des vertébrés présentent dans leur diversité morphologique des adaptations parfaitement réussies aux multiples conditions de l'environnement. Chez les vertébrés supérieurs, les membres servent aussi bien à voler, à nager, à creuser, à attraper ou à jouer la Passacaille, bien que leur structure de base (la séquence et l'arrangement spatial des éléments osseux) soit toujours la même [1]. Ceci implique l'existence d'une stratégie unique de développement pour la construction du membre (le plan du membre) qui très tôt impose un schéma de base, sur lequel des caractéristiques spécifiques des espèces apparaissent [2]. La description d'un tel plan universel du membre et l'idée, que les processus génétiques qui le génèrent sont très anciens, sont restés des éléments controversés pendant plus d'un siècle [3, 4, 5]. Aussi, est-il intéressant de se demander comment les découvertes récentes des gènes clés de ces processus peuvent apporter de nouveaux arguments pour éclairer ce débat ?

SUMMARY : Vertebrate limbs are an amazing example of successful adaptation to various environmental conditions. In higher vertebrates, forelimbs help to fly, swim, walk, dig, grasp or play the Passacaille, yet their basic structure (the sequence and spatial arrangement of bony elements) is always the same [1]. This implies the existence of a unique developmental strategy for building a limb (a limb plan) that imposes early on a basic scheme, on the top of which subsequent species-specific customizations will occur [2]. The description of such a universal limb plan, hence the idea that the genetic and developmental processes that generate this plan are very ancient, has been controversial for about a century [3, 4, 5]. It is worth asking whether recent discoveries of important genes involved in these processes can bring novel arguments to the debate.

MOTS-CLÉS : *Hox*. – Membre. – Développement.

KEY-WORDS : *Hox*. – Limb. – Development.

INTRODUCTION

Le développement du membre est caractérisé par deux phénomènes essentiels. Tout d'abord, une structure doit être produite, ce qui implique que les cellules prolifèrent rapidement. Ensuite, cette struc-

ture doit être organisée, ce processus est habituellement appelé modélisation. Même si ces deux aspects de l'ontogénèse du membre ont souvent été considérés comme relativement indépendants, il apparaît de plus en plus évident qu'ils sont étroitement liés, en particulier au niveau de leurs contrôles génétiques.

Laboratoire d'Embryologie Moléculaire et Morphogénèse, Département de Zoologie et Biologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Genève, Science III, 30 quai Ernest Ansermet, 1211 GENEVE 4 (Suisse).

Formation d'un bourgeon appendiculaire

Les membres émergent du tronc sous la forme de bourgeons. Ceux-ci sont composés de différentes régions, chacune possédant des fonctions spécifiques [6, 7]. La « crête apicale ectodermique » (« Apical Ectodermal Ridge » ou AER) est une structure distale de cellules ectodermiques différenciées qui maintient la prolifération des cellules localisées en dessous, dans la « zone de progrès » (PZ). D'autre part, une aire située postérieurement, la « zone d'activité polarisante » (ZPA), est impliquée dans l'établissement de la polarité antéro-postérieure (fig. 1). L'information de modélisation est délivrée au niveau de la PZ. Ainsi, après avoir quitté cette région au cours du bourgeonnement du membre, les cellules perdent leur capacité de croissance et commencent à se différencier, puis se condensent pour former des blastèmes. Ces condensations pré-cartilagineuses se diversifient pas la suite, soit par branchements, soit par segmentations pour donner les différents éléments squelettiques [8]. Une des caractéristiques majeures de la formation du membre découle de ce phénomène de croissance apicale : le membre se développe en suivant une progression proximo-distale, de telle sorte que le stylopode (le bras) est déterminé et fabriqué avant le zeugopode (l'avant-bras) puis l'autopode (la main). Par conséquent, l'information de modélisation n'est pas seulement différente en terme de qualité mais également en terme d'occurrence dans le temps. La fabrication d'un membre complet est donc un processus progressif par lequel les parties tardives (distales) se développent à partir des structures déjà formées.

Depuis quelques années, plusieurs molécules ont été identifiées de part leur capacité à mimer certaines des fonctions des régions du bourgeon. Ainsi, le facteur de croissance *FGF-8* (« Fibroblast Growth Factor 8 »; [9]) est un des acteurs participant à l'initiation du bourgeon appendiculaire. Sa sécrétion par les cellules du mésoderme des pièces intermédiaires, au niveau des futures aires des bourgeons (fig. 1Aa; flèche), va conduire à la synthèse de ce même facteur dans les cellules ectodermiques, localisées sur une ligne séparant la face ventrale de la face dorsale de l'embryon. Ces cellules formeront plus tard l'AER. Elles maintiendront la prolifération des cellules mésenchymateuses de la PZ par la synthèse d'autres facteurs de type FGF ([9, 10, 11, 12]; fig. 1Ab; flèches). L'AER a aussi pour fonction d'induire la formation d'une aire spécialisée située postérieurement au niveau du bourgeon, la région d'activité polarisante (fig. 1Ab, c; ZPA). Cette dernière possède la singulière capacité d'organiser la partie distale du bourgeon appendiculaire. Ainsi, quand des cellules de la ZPA sont greffées sur la marge antérieure du bourgeon de l'aile de poulet, il en découle une spectacu-

laire duplication en miroir des doigts de l'aile (fig. 1Ba). Cet effet peut être reproduit à différents degrés par l'application de molécules comme le produit du gène *sonic hedgehog* (*shh*) [6, 7] dont l'activité est présente dans la ZPA et qui en est vraisemblablement l'agent actif principal.

D'autres protéines sont impliquées dans la détermination des faces ventrales ou dorsales des membres. Ainsi, les souris homozygotes pour une mutation du gène *En-1*, normalement exprimé par les cellules de l'ectoderme ventral du bourgeon, ont des mains qui n'ont plus de face ventrale mais, par contre, deux faces dorsales [13]. Inversement chez les souris mutantes pour *Wnt-7a*, les mains sont formées de deux faces ventrales [14]. Le rôle de la protéine *WNT-7A*, sécrétée par les cellules de l'ectoderme dorsal du bourgeon, dans l'établissement de l'axe dorso-ventral du membre, a aussi été vérifié à l'occasion d'expériences de sur-expression ectopique [15, 16]. De manière inattendue, ces sur-expressions ont également permis d'observer un effet négatif sur la formation des autres axes, conduisant à considérer que l'ensemble de ces molécules, *FGF*, *SHH* et *WNT-7A*, participent à un réseau coordonné de signaux qui définissent les trois axes de symétrie du membre [7, 17]. Ainsi, la sécrétion de *FGF-4* dans la partie postérieure de l'AER, associée à la synthèse de *WNT-7A* par l'ectoderme dorsal du bourgeon, maintient la production de *SHH* dans la ZPA, qui en retour ira stimuler la production de *FGF-4* au niveau de l'AER postérieure, établissant ainsi une boucle rétroactive [18, 19, 20]; fig. 1Ac, flèche courbe). D'autres molécules de type *FGF*, ou appartenant à la famille des *BMPs* (« Bone Morphogenetic Protein ») ou des *TGFβs* (« Transforming Growth Factor Beta ») sont exprimées dans les zones spécialisées du membre. Bien que leurs rôles ne soient pas encore bien définis [11, 21, 22, 23, 24, 25], certaines de ces molécules pourraient être impliquées dans la mort cellulaire [26, 27] ou dans le recrutement des précurseurs non-chondrogéniques pour former des cartilages [27, 28]. L'ensemble de ces signaux est relayé au niveau cellulaire par l'activation de facteurs de transcription. *LMX1* est ainsi exprimé par les cellules du mésoderme dorsal en réponse à *WNT-7A* [15, 16] alors que les produits de *shh* et de *Fgf-4* sont capables de stimuler et maintenir l'expression des gènes architectes *HoxD* [12, 18, 29].

La greffe par transplantation d'une ZPA sur la marge antérieure du membre, conduit à ce qui était parfois interprété comme une re-spécification ou une modification du patron global de l'aile (par exemple, [7]). Cependant, le patron original de l'aile (doigts 2, 3 et 4) demeure inchangé chez les animaux greffés (fig. 1B, comparez les rectangles dans a et b). Dans ces expériences, la production de

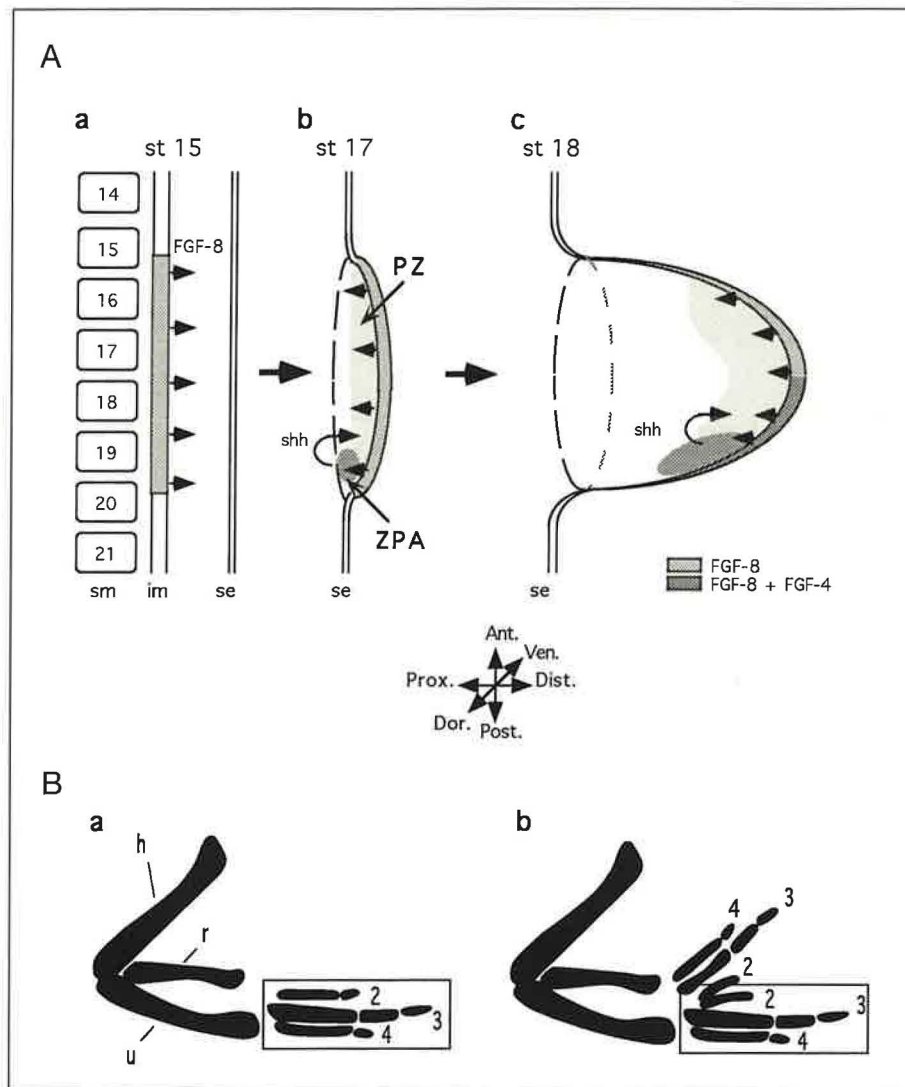


Fig. 1. – Le développement du membre. (A) vue schématique du membre antérieur de poulet en développement à un stade précoce (st 15) et au stade plus tardif du bourgeon (st 18) possédant une crête apicale ectodermique (AER), une zone de progrès (PZ) et une zone d'activité polarizante (ZPA). Au stade 15 commence la sécrétion de facteur *FGF-8* par les cellules du mésoderme intermédiaire (im) au niveau du futur territoire présomptif du membre qui va conduire à l'induction de l'expression du *FGF-8* au niveau de l'ectoderme sus-jacent (se, stade 17), puis à l'activation du gène *shh* dans la partie postérieure (ZPA, stade 17) du bourgeon. Une cascade s'ensuit, entraînant la synthèse de *FGF-4* au niveau de l'AER. Dans ce schéma, les interactions avec les signaux dorso-ventraux ne sont pas montrées (D'après [9]). **(B)** Squelette normal d'une aile de poulet (à gauche) comparé à celui d'une aile après la greffe d'une ZPA sur la marge antérieure (à droite). Le rectangle délimite le squelette original et démontre que le patron de départ reste inchangé chez l'animal manipulé. h : humerus ; r : radius ; u : ulna. Les doigts sont numérotés de postérieur (4) vers antérieur (2).

Fig. 1. – The development of the limb. (A) Schematic view of a developing chicken forelimb bud, from an early stage (st15) to older stages (up to st 18) showing the apical ectodermal ridge (AER), the progress zone (PZ) and the zone of polarizing activity (ZPA). At stage 15, the *FGF-8* growth factor starts to be secreted by intermediate mesoderm (im) cells, at the level of the future limb buds, which will then induce the expression of *FGF-8* in surface ectoderm (se, stage 17). The *shh* gene will be activated by *FGF-8* in the posterior bud mesoderm (ZPA, stage 17), which will induce, in turn, the synthesis of *FGF-4* in the AER. In this scheme, the interactions with dorso-ventral signals are not shown (adapted from Crossley, 1996 #84). **(B)** Normal chick wing skeleton (left) compared with a skeleton obtained after implantation of a ZPA at the anterior margin of a host bud (right). The rectangles show that the original skeletal pattern is not affected in the grafted animal. h : humerus ; r : radius ; u : ulna. Digits are numbered from posterior (4) to anterior (2).

la structure surnuméraire est associée à une réponse de prolifération cellulaire. Aussi la ressemblance, entre le patron de la structure pré-existante et celui, bien qu'inversé, de la structure surnuméraire, pourrait être expliqué si l'asymétrie antéro-postérieure, dans le membre, dépend des différents états de croissance des populations cellulaires le long de cet axe (antérieur étant la valeur par défaut). Une légère sur-prolifération donnerait un doigt antérieur alors qu'une prolifération massive générerait toute la palette des doigts. Cette hypothèse semble être confirmée par la situation normale puisque le mésenchyme semble proliférer un peu plus rapidement dans la région postérieure du membre que dans la région antérieure; une possibilité confirmée par la carte des territoires présomptifs et d'autres données [30]. Quand un fort taux de prolifération est induit dans la partie antérieure du membre, comme dans les traitements expérimentaux décrits précédemment, les cellules pourraient progresser de plusieurs étapes dans la séquence de développement et changer leur devenir afin de produire des structures postérieures. Si la prolifération est limitée à la zone la plus distale, les cellules du doigt 2 seront devenues plus «postérieures» en entraînant la suppression du doigt le plus antérieur dans la structure dupliquée. Dans un tel schéma, la prolifération engendre la modélisation, qui n'existe donc pas dans un système qui ne prolifère pas. La production de structures surnuméraires identiques à celles préexistantes démontre la stabilité des mécanismes à l'intérieur d'une espèce donnée et l'existence de contraintes développementales très fortes. Ceci illustre aussi la grande difficulté de produire des structures aléatoires, sans organisation précise.

Les gènes architectes

Quelles pourraient être les bases moléculaires d'un tel processus antéro-postérieur, progressif et unidirectionnel, liant prolifération et modélisation? Une part importante de ce mécanisme doit probablement dépendre de l'activation précisément orchestrée des gènes architectes de la famille *Hox*.

Les 39 gènes *Hox* présents chez les vertébrés sont regroupés dans le génome en quatre complexes : *HoxA*, *B*, *C* et *D* (fig. 2A; [31, 32, 33]). Chaque complexe, localisé sur un chromosome particulier, contient 9 à 11 gènes, transcrits à partir du même brin d'ADN et régulièrement répartis sur 100 à 150kb [34]. L'analyse des séquences a révélé que les gènes *Hox* étaient les homologues des gènes homéotiques des complexes *Antennapedia* et *Bithorax* (*ANT-C* et *BX-C*) de la mouche drosophile, si ces deux complexes sont artificiellement regroupés (fig. 2A). Il semble donc qu'au cours de l'évolution un complexe ancestral *HOM-C/HOX* ait été séparé chez les arthropodes, ou amplifié dans la

lignée des vertébrés [35, 36]. Comme conséquence de ces duplications, les gènes, localisés à des positions identiques à l'intérieur des complexes *Hox*, présentent de plus importantes homologies de séquence et la même dynamique d'expression. Ils définissent ainsi 13 sous-groupes ou paralogues [32]. De plus, comme chez la drosophile, leur expression spatiale est réalisée séquentiellement en suivant l'ordre des gènes le long du chromosome dans des domaines de plus en plus restreints (voir les références dans [37]). Brièvement, les gènes, situés près de l'extrémité 3' des complexes, sont exprimés à un stade précoce au cours de l'embryogenèse et dans des domaines antérieurs (comme le rhombencéphale). Au contraire les gènes en position 5' de ces complexes sont activés tardivement dans des aires progressivement plus postérieures dans les structures axiales, ou plus distales dans les structures appendiculaires (comme les membres ou le tubercule génital).

En fonction de leur appartenance à un complexe donné, les gènes *Hox* présentent quelques particularités au niveau de leur domaine d'expression dans les membres [38]. Ainsi, la première partie du membre, dans laquelle les gènes *Hoxa* et *Hoxd* sont activés, correspond à la région postérieure. Ensuite les domaines d'expression des gènes *Hoxd* s'étendent plus antérieurement dans les parties les plus distales tout en conservant une polarisation antéro-postérieure (fig. 2B, flèche). Par contre, cette polarité n'est pas observée pour les aires d'expression des gènes *Hoxa* qui deviennent alors uniquement distales (fig. 2B; [38, 39]). L'activation colinéaire des gènes *Hoxa* et *Hoxd* survient donc uniquement dans la zone de progression [40]. Il est alors fort possible que le taux élevé de division cellulaire dans cette zone puisse entraîner une activation de gènes *Hox* supplémentaires dans les cellules postérieures que dans celles antérieures. Ainsi, lors du traitement *in situ* des cellules antérieures par des agents mitogènes, l'activation de gènes *Hox* supplémentaires est observée [10, 18]. Il en découle une production de structures plus postérieures. Dans ce modèle, il est alors difficile, voire impossible, de produire une extra-structure qui ne ressemble pas à l'original.

Des expériences d'inactivation des gènes homologues à *Abdominal B* et positionnés en 5' des complexes *HoxA* et *HoxD* (voir fig. 2A) ont apporté des preuves supplémentaires quant à l'étroite relation entre la prolifération et la modélisation. En particulier, l'absence du produit du dernier gène du complexe *HoxD*, *Hoxd-13*, le plus tardif et le plus postérieur, entraîne un retard général de la morphogenèse des extrémités. Les os sont plus petits dans tous les doigts, indiquant que le membre n'a pas été correctement terminé [41]. Les modifications du squelette appendiculaire, observées lors de l'inacti-

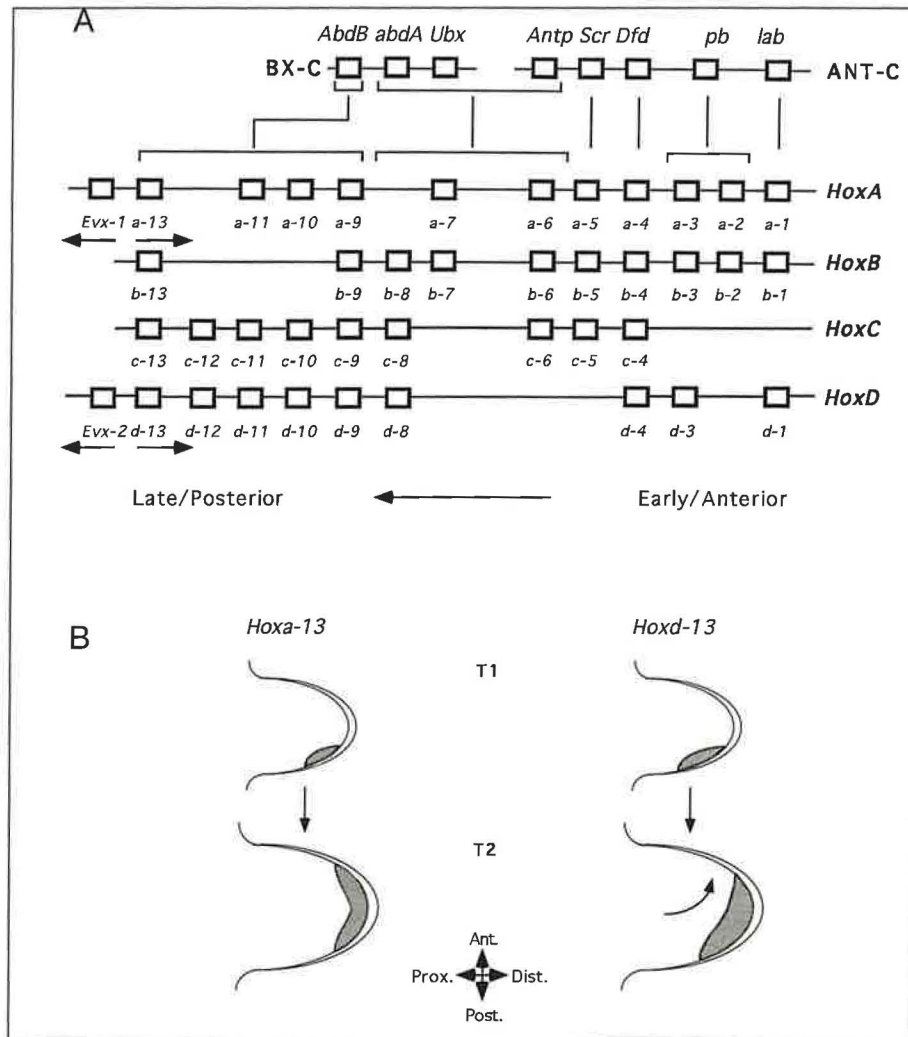


Fig. 2. – Les gènes architectes *Hox*. (A) Organisation structurale des gènes *Hox* des vertébrés et leur correspondance avec les complexes homéotiques de la mouche drosophile. La partie supérieure montre les deux complexes homéotiques *Bithorax* (BX-C) et *Antennapedia* (ANT-C). Les lignes indiquent la relation phylogénétique entre ces gènes et les gènes *Hox* murins. Les gènes *Hox* sont localisés sur quatre complexes différents (*HoxA* à *HoxD*) et les gènes paralogues sont situés sur des lignes verticales. Tous les gènes *Hox* sont transcrits de gauche à droite, alors que les deux gènes *Evx* localisés aux extrémités 5' des complexes *HoxA* et *HoxD* sont transcrits à partir du brin complémentaire. (B) Domaines d'expression des gènes murins *Hoxa-13* et *Hoxd-13* au stade de jeune bourgeon (en haut et T1) et durant la formation de la main (en bas et T2). Après une expression initiale restreinte postérieurement (T1), les domaines s'étendent antérieurement dans la partie la plus distale (T2). Dans le cas de *Hoxd-13*, l'antériorisation conduit à une courbure des domaines (voir flèche) qui pourrait refléter la torsion de l'axe majeur du membre (la formation de l'arche digitale) montrée dans la figure 4.

Fig. 2. – The *Hox* Gene family. (A) Structural organisation of the mammalian *HOX* gene complexes and their correspondence with the *Drosophila* homeotic complexes. The upper part shows the two homeotic *Bithorax* (BX-C) and *Antennapedia* (ANT-C) complexes. The lines indicate the cognate relationships between these genes and the mouse *Hox* genes. The *Hox* genes are found in four different complexes (*HoxA* to *HoxD*) and paralogous genes are located on the same vertical line. All *Hox* genes are transcribed from left to right. In contrast, the two *evx* genes located at the 5' end of both *HoxA* and *HoxD* complexes are transcribed from the opposite strand. (B) Expression domains of the mouse *Hoxa-13* and *Hoxd-13* genes at an early bud stage (top, T1) and during handplate formation (bottom, T2). After an initial expression restricted posteriorly (T1), the domains extend anteriorly, in the most distal part (T2). In the case of *Hoxd-13*, the anteriorization results in skewed expression boundaries (see arrows) that may reflect the bending of the major limb axis (the formation of the digital arch) as shown in figure 4.

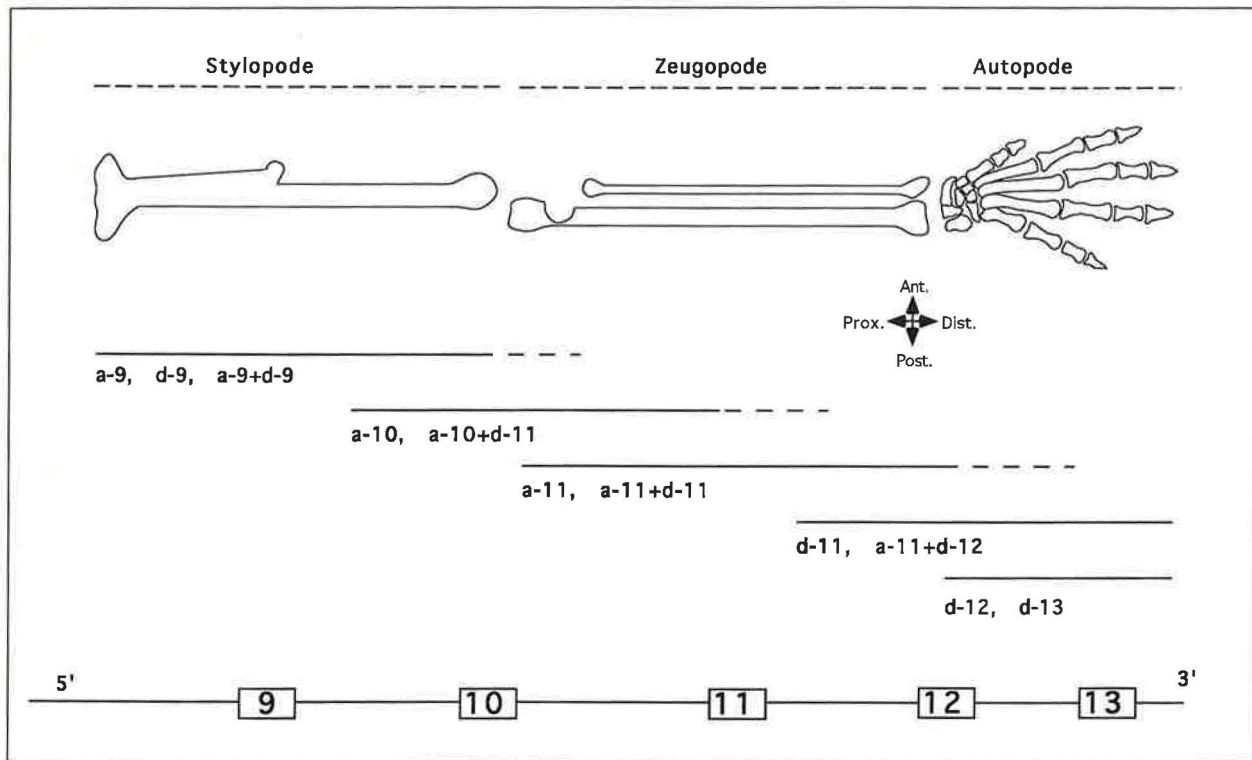


Fig. 3. – Localisation des altérations morphologiques observées dans les membres des souris mutantes pour les gènes localisés en 5' des complexes *HoxA* et *HoxD*. Le nom du ou des gènes mutés est indiqué sous les lignes qui rendent compte des zones affectées pour chacun des simples ou doubles (+) mutants. Les gènes *Hox* paralogues et non paralogues interagissent ensemble pour définir le long de l'axe proximo-distal (de gauche à droite) la formation des différents éléments osseux du membre. (tiré de: *Hoxa-9* et *Hoxd-9* [42], *Hoxa-10* [43], *Hoxa-11* [44], *Hoxd-11* [45, 46], *Hoxd-12* [47, 48], *Hoxd-13* [41]).

Fig. 3. – Localization of morphological alterations observed in limbs of mice mutant for the 5'-located genes of the *HoxA* and *HoxD* complexes. The name of mutated genes are indicated below the lines which display the extent of the defects observed in either simple or double mutants (+). Paralogous and non-paralogous *Hox* genes interact which each others to define the structure of limb bony elements (from : *Hoxa-9* and *Hoxd-9* [42], *Hoxa-10* [43], *Hoxa-11* [44], *Hoxd-11* [45, 46], *Hoxd-12* [47, 48], *Hoxd-13* [41]).

vation des gènes *HoxA* et *HoxD*, peuvent être interprétées comme résultantes soit d'une limitation de la capacité à recruter assez de cellules pour les condensations des futures cartilages, soit comme une conséquence attendue d'une baisse du taux de prolifération (*Hoxa-9*, *Hoxd-9* [42], *Hoxa-10* [43], *Hoxa-11* [44], *Hoxd-11* [45, 46], *Hoxd-12* [47, 48] et *Hoxd-13* [41]). Chez ces mutants, les altérations sont réparties suivant une orientation proximo-distale dans les différents segments du membre. Leur localisation correspond au domaine d'expression du gène muté et par conséquent à sa position au sein du complexe (fig. 3). Un gène exprimé précocement dans un domaine proximal (comme *Hoxd-9*) aura une fonction déterminante dans la modélisation du stylopode, alors qu'un gène exprimé tardivement dans un domaine distal (comme *Hoxd-13*) aura un rôle majeur dans la formation de l'autopode. De plus, il existe des redondances de fonctions entre gènes paralogues,

souvent associées à un effet de dose de compensation. Ainsi, la double mutation des gènes *Hoxa-9* et *Hoxd-9* entraîne un raccourcissement du stylopode plus important que chez les mutants d'un seul de ces deux gènes [42]. Ceci est encore plus frappant chez des double-mutants pour les gènes *Hoxa-11* et *Hoxd-11* dans lesquels le radius et l'ulna sont quasiment absents, alors qu'une seule copie sauvage d'un de ces paralogues est capable de préserver la formation du zeugopode [49]. Cependant, la fonction d'un groupe de paralogues ne doit pas être associée à un seul segment du membre. En effet, des redondances fonctionnelles ont été également mises en évidence entre gènes non-paralogues. Par exemple, les gènes *Hoxa-10* et *Hoxd-11* [43], ou encore les gènes *Hoxa-11* et *Hoxd-12* [47] ont une action synergique sur la formation du zeugopode. La corrélation entre les domaines d'expression et la localisation des altérations chez les mutants des gènes *Hox* est évidente au niveau du

stylopode et du zeugopode. Néanmoins, le rôle de ces gènes au cours de la morphogenèse de l'autopode est beaucoup plus complexe. Ainsi, même si les mutations de chacun des gènes *Hoxd* des groupes 11 à 13 entraînent des altérations spécifiques de certains éléments de la main [41, 45, 46, 47, 48], la combinaison de ces mutations dans des animaux trans-hétérozygotes démontre qu'ils interagissent en synergie dans la formation de l'autopode, tout en suivant le principe de prévalence postérieure [50]. Ce principe rend compte d'une hiérarchie fonctionnelle des gènes *Hox*, organisée selon leur position relative sur le complexe. Il se caractérise par la suppression d'un phénotype d'un gène antérieur par le produit d'un gène plus postérieur au niveau du domaine d'expression de ce dernier. Ce phénomène a été observé à plusieurs reprises au niveau du tronc et des membres. Ainsi, un simple mutant *Hoxd-11*, ou *Hoxd-12*, aura un phénotype moins sévère qu'un mutant *Hoxd-13* au niveau de l'autopode [41, 47, 48]. Par contre, chez un triple mutant pour les gènes *Hoxd-11*, *d-12* et *d-13*, l'altération de l'autopode sera plus importante que l'addition des trois phénotypes [51]. Ces études soulignent la position hiérarchique dominante du gène *Hoxd-13* dans la modélisation de la structure finale de l'autopode.

Contrairement à des hypothèses largement répandues, l'information de modélisation du membre ne semble donc pas être distribuée par un système de gradients et de coordonnées définis le long des axes antéro-postérieurs et proximo-distals. « L'identité » d'un segment donné du membre semble plutôt être fixée par des petites variations dans l'équilibre de l'information à l'intérieur du même plan de construction et par la mise en œuvre progressive de nouveaux gènes. La construction d'un membre ne se fait pas à partir d'un système de coordonnées cartésiennes définissant les structures comme des pions sur un échiquier, mais plutôt selon un référentiel dynamique avec trois dimensions spatiales et une temporelle. Le membre est une structure homogène et cohérente, ce n'est pas l'addition de morceaux définis séparément.

L'axe majeur du membre

Chez la plupart des tétrapodes, la mise en place du motif pré-chondrogénique du membre (le futur squelette) suit une séquence spatiale et temporelle conservée et bien définie, faite de condensations spontanées, de segmentations et de branchements. Sur la base d'une analyse embryologique comparée de ce processus chez plusieurs vertébrés, Shubin et Alberch [52] proposent l'idée selon laquelle l'axe principal du membre (l'axe de base du plan du membre) passe par l'humérus, l'ulna, l'ulnare et est ensuite infléchi antérieurement pour former l'arche

digitale, qui correspondra plus tard à la rangée distale des os carpiens (fig. 4B). C'est un axe dynamique établi sur les apparitions progressives des foyers de condensations pré-condrogéniques qui donneront naissance aux éléments osseux du membre. Une correspondance frappante existe entre cette courbure hypothétique de l'axe majeur et la transition postéro-distale dans les domaines d'expression des gènes *Hoxd* activés lors de l'excroissance du membre [37, 53, 54, 55], ce qui laisse supposer que les gènes *Hoxd* sont impliqués dans la courbure terminale de cet axe. En terme de prolifération cellulaire, cela conforte l'idée selon laquelle les cellules postérieures (postaxiales) vers l'extrémité distale du membre en développement (l'autopode) tendent à diriger la majeure partie de la morphogenèse des doigts.

La relation entre prolifération, condensation et mécanismes de branchement est spéculative [52]. Cependant, plusieurs évidences laissent penser que les gènes *Hox* sont impliqués directement dans ces phénomènes. Dans un premier temps, la sur-expression du gène *Hoxa-13* a permis de démontrer que ces gènes pouvaient influencer la croissance cellulaire et la différenciation du cartilage par le contrôle des capacités d'adhérence des cellules [56]. Dans cette perspective, l'augmentation locale du nombre de cellules capables de se condenser peut conduire un blastème à se diviser par branchement. De même, une diminution locale du nombre de cellules peut entraîner l'arrêt prématuré d'une condensation. Par conséquent, les produits des gènes *Hox* pourraient intervenir non seulement dans le contrôle des voies de prolifération, mais aussi dans les voies de condensation et de segmentation : l'activation progressive des gènes *Hox* dans des sous-populations cellulaires de la partie postérieure du membre pourrait engendrer un patron précis de condensation en fonction des masses cellulaires à disposition. Ainsi, ils seraient responsables de la mise en place du patron du membre.

Des nageoires aux doigts

Ces résultats, ainsi que les nouvelles bases conceptuelles qu'ils engendrent, peuvent-ils nous aider à comprendre l'évolution des appendices chez les vertébrés ? Le passage de la vie aquatique à un environnement terrestre a été accompagné d'importantes modifications du squelette appendiculaire. Chez les fossiles des poissons à nageoires lobées, et dans les espèces survivantes représentant des taxons de base, comme le dipneuste *Neoceratodus*, un poisson pulmoné, le squelette des nageoires pectorales montre un axe majeur s'étendant de l'os le plus proximal jusqu'à l'extrémité distale de la partie endosquelettique. Cette situation est quelque peu similaire aux nageoires pectorales des poissons car-

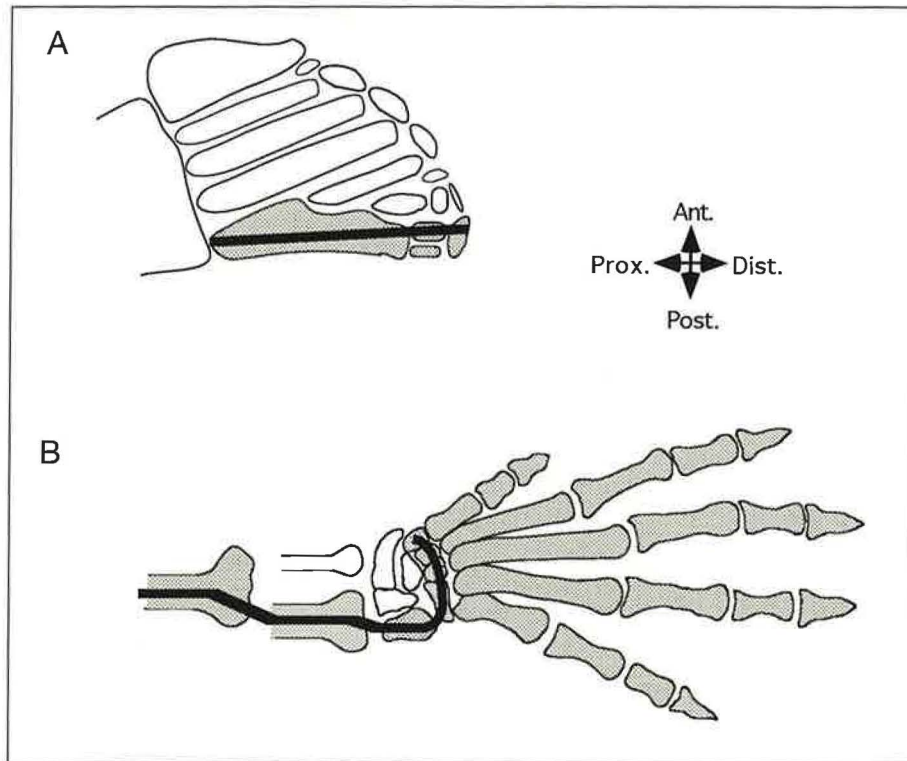


Fig. 4. – Position proposée de l'axe métaptérygien (trait gras) chez les esturgeons (*Acipenser*) (A) et dans la patte de souris (B). Les éléments post-axiaux sont de couleur grise. Les données sont adaptées de [8].

Fig. 4. – Proposed position of the metapterygial axis (bold line) in sturgeons (*Acipenser*) (A) and in mouse limb (B). The post-axial elements are in gray. Adapted from [8].

tilagineux vivants, comme les requins ou des actinoptérygiens primitifs comme les esturgeons (fig. 4A; [52]). L'homologie entre cet axe métaptérygien droit et l'axe courbé des vertébrés supérieurs (fig. 4A et 4B) a fourni de nouveaux éclaircissements sur la relation ontogénique entre ces appendices divergents [4, 52, 57, 58], laissant supposer : soit que la partie distale du membre est homologue à la partie distale mais postérieure d'une nageoire ancestrale, soit qu'il n'existe pas de structure homologue chez les poissons ancestraux. Dans cette dernière hypothèse, la transition de la nageoire au membre pourrait avoir impliqué une stimulation de la prolifération post-axiale de la nageoire en développement, simultanément à la formation de l'autopode.

L'absence d'une structure homologue à l'autopode des vertébrés supérieurs est frappante chez les poissons téléostéens, tels que la truite ou le poisson zèbre. En effet, dans la nageoire pectorale de ces

poissons, la partie osseuse est réduite comparative-ment au squelette ectodermique, flexible, qui constitue la majeure partie du membre et qui a une origine différente au cours du développement. Au cours de la formation de la nageoire, la région du futur endosquelette s'arrête de proliférer juste après le bourgeonnement, probablement à cause de changements dans la couche ectodermique sus-jacente, qui se plisse sur elle-même pour servir de support au squelette ectodermique de la nageoire. Dans ce contexte, une hypothèse a été proposée [59], selon laquelle le laps de temps, où s'effectue la transition entre la crête apicale et le repli apical, pourrait déterminer l'étendue du développement des éléments de l'endosquelette. Une transition précoce, juste après le bourgeonnement, engendrerait une nageoire pectorale de type téléostéen, alors qu'une transition tardive entraînerait plus de prolifération à l'intérieur de la future partie de l'endosquelette et donc permettrait à plus d'éléments de se différencier. Dans cette optique, le membre des tétrapodes

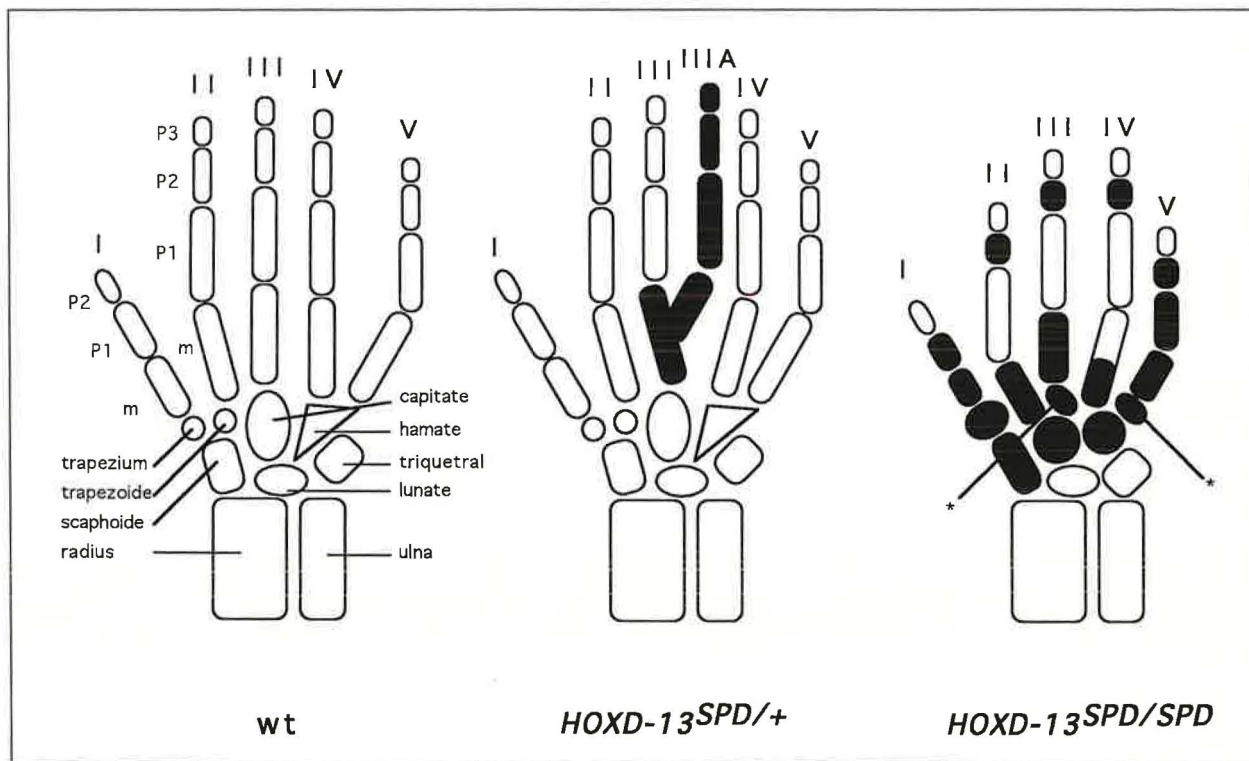


Fig. 5. – Représentation schématique et comparaison des squelettes des mains normales (wt) et des mains de patients souffrant de synpolydactylie à l'état hétérozygote (*Hoxd-13^{SPD/+}*) et homozygote (*Hoxd-13^{SPD/SPD}*). Les os dont la forme est altérée sont de couleur noire. Les doigts sont numérotés de I à V, du pouce à l'auriculaire. m : métacarpe ; P1, P2 et P3 phalanges (d'après [62]).

Fig. 5. – Schematics of a human hand skeleton in normal (wt), heterozygous (*Hoxd-13^{SPD/+}*) or homozygous (*Hoxd-13^{SPD/SPD}*) for the synpolydactyly syndrome. Bones with an abnormal shape are in black. Digits are numbered from I to V, from thumb to minimus. m : metacarpal ; P1, P2 et P3 phalanges (Adapted from [62]).

représente un cas extrême avec une prolifération étendue de la partie endosquelettique et une absence coïncidente de squelette dermique. Par conséquent, les similitudes morphologiques et moléculaires, entre les appendices antérieurs et postérieurs, pourraient refléter une expansion relativement comparable de la prolifération cellulaire dans ces deux types de membres, plutôt que l'effet d'une soudaine transformation d'une structure à l'image de l'autre.

L'étude de l'expression des gènes *Hoxa* et *Hoxd* au cours du développement de la nageoire chez le poisson Zèbre (*Danio rerio*) a permis d'établir une base moléculaire aux homologies entre les appendices des vertébrés [60, 61]. En effet, chez ce poisson, les domaines d'activation des gènes *Hoxa* et *Hoxd* sont localisés dans des aires similaires. Cependant, lors des phases secondaires d'expression de ces gènes, aucune antériorisation des domaines d'expression des gènes *Hoxd*, marqueurs

de la formation des doigts, n'est observée alors que le domaine d'expression de *Hoxa-11*, marqueur de la formation du zeugopode, reste confiné à la partie la plus distale de la nageoire. Il apparaît donc que la nageoire est dépourvue de la phase tardive d'expression des gènes *Hoxa* et *Hoxd*. L'autopode doit donc vraisemblablement être considéré comme une structure néomorphe, présente exclusivement chez les vertébrés tétrapodes. Son apparition serait le résultat d'une prolifération inégale de la marge postérieure d'une nageoire ancestrale, après que les gènes *Hox* aient « acquis » leur phase secondaire d'expression, peut-être en réponse à un nouveau système de croissance postérieure impliquant les gènes *shh* et *Fgf-4* [61].

Vers une génétique de la digitation ?

Les gènes *Hoxa* et *Hoxd* participent donc à la mise en place du plan des membres chez les vertébrés. Par la même, ils font partie d'un nouveau

schéma évolutionniste de la transition nageoire-membre dans lequel la transition serait surtout d'ordre quantitatif, notamment concernant la croissance cellulaire, plutôt que qualitatif. Il ne s'agirait pas d'une transformation de structure mais, au contraire, du rajout d'une pièce supplémentaire et fondamentale; les doigts. Bien évidemment, il se pourrait que ces gènes ne soient pas directement responsables des variations de prolifération de la partie endosquelettique mais qu'ils se soient simplement adaptés à ces variations de telle sorte que la stimulation de la prolifération favorise et maintienne leur activation de manière post-axiale. Cependant, les gènes *Hox* pourraient aussi contrôler la croissance du bourgeon en agissant indirectement sur l'ectoderme sus-jacent et seraient ainsi directement impliqués en entraînant les variations de ce phénomène. Par exemple, une expression forte et soutenue des gènes *Hox*, au niveau postérieur, pourraient stimuler la prolifération tout en étant contrôlée par l'ectoderme. L'analyse des gènes correspondants dans d'autres espèces pertinentes aidera à choisir entre ces alternatives.

Dans tous les cas, la découverte récente qu'une mutation dans le gène *Hoxd-13* est responsable d'un type de synpolydactylie (SPD) chez l'homme [62] démontre de façon éclatante l'importance de ces protéines pour l'ontogenèse d'une digitation normale. La SPD, ou syndactylie de type II (OMIN number 186000), est une maladie génétique humaine qui se caractérise notamment par une déformation congénitale de la main et qui se transmet comme un trait autosomal dominant. Les individus hétérozygotes ont une syndactylie des doigts III et IV, avec apparition d'un doigt supplémentaire entre eux, qui se forme à partir d'un métacarpe

additionnel plus ou moins fusionné au métacarpe voisin (fig. 5). Les homozygotes présentent un phénotype plus sévère: une syndactylie complète des tissus mous, associée à la perte de la forme tubulaire des os des carpes, des métacarpes, des phalanges et à l'apparition de nouveaux petits os carpiens (fig. 5). Le phénotype observé chez les patients est plus important que celui décrit chez les souris qui n'ont pas de gène *Hoxd-13* fonctionnel [41]. Ceci laisse largement penser que la SPD humaine est causée par l'inactivation simultanée de plusieurs gènes *Hox*, probablement par la production d'une protéine *HOXD-13* rendue dominante négative par la mutation. La caractérisation de ces gènes chez la souris, qui font l'objet d'études poussées depuis bientôt dix ans, va donc permettre la production de systèmes d'études génétiques de syndromes humains affectant la digitation. Gageons qu'une compréhension nouvelle et étendue de l'étiologie génétique de ses malformations en émergera. Une approche combinée similaire d'autres syndromes humains impliquant d'autres «gènes de la digitation», comme par exemple les récepteurs au FGFs (syndrome de Crouzon, d'Apert ou de Jackson-Weiss (pour revue voir [63, 64])) permettra sans doute, dans un avenir proche, de poser les bases d'une vraie génétique moléculaire de la digitation.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les membres du laboratoire d'Embryologie Moléculaire et Morphogénèse pour leur collaboration. Ce laboratoire est soutenu par le Fond National Suisse de la Recherche, le programme HFSP, le Canton de Genève et les fondations Claraz et Latsis. Y. H. a été soutenu par des bourses de l'ARC et de l'EMBO.

RÉFÉRENCES

- OWEN R. – On the nature of limbs, V. d. H. J. (ed.), (1849), London.
- GEGENBAUR C. – Das archipterygium. *Jena Z Naturw*, 1872, 7, 131-141.
- DUBOULE D. – How to make a limb? *Science*, 1994, 266, 575-576.
- SHUBIN N. – The evolution of paired fins and the origins of the tetrapod limbs. Phylogenetic and transformational approaches, p. 39-86. In: HECH M.K., MACINTYRE R.J., CLEGG M.T. (ed.), *Evolutionary biology*, (1995), Plenum Press: New York.
- COATES M. – The origin of the vertebrate limb. *Development*, 1994, Supplement, 169-180.
- TABIN C. – The initiation of the limb bud: growth factors, *Hox* genes, and retinoids. *Cell*, 1995, 80, 671-674.
- TICKLE C. – Vertebrate limb development. *Cur. Opi. Gen. Dev.*, 1995, 5, 478-484.
- SHUBIN N.H., ALBERCH P. – A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evol. Biol.*, 1986, 20, 319-387.
- CROSSLEY P.H., MINOWARDA G., McARTHUR C.A., MARTIN G.R. – Roles for *FGF8* in the induction, initiation and maintenance of chick limb development. *Cell*, 1996, 84, 127-136.
- NISWANDER L., TICKLE C., VOGEL A., BOOTH I., MARTIN G.R. – *FGF-4* replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, 1993, 75, 579-87.
- FALLON J.F., LOPEZ A., ROS M.A., SAVAGE M.P., OLWIN B.B., SIMANDL B.K. – *FGF-2*: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, 1994, 264, 104-7.
- COHN M.J., IZPISUA-BELMONTE J.C., ABUD H., HEATH J.K., TICKLE C. – Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*, 1995, 80, 739-746.
- LOOMIS C.A., HARRIS E., MICHAUD J., WURST W., HANKS M., JOYNER A.L. – The mouse *Engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature*, 1996, 382, 360-363.
- PARR B.A., McMAHON A.P. – Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 1995, 374, 350-353.
- VOGEL A., RODRIGUEZ C., WARNKEN W., IZPISUA-BELMONTE J.C. – Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature*, 1995, 378, 716-720.
- RIDDLE R.D., ENSINI M., NELSON C., TSUCHIDA T., JESSELL T.M., TABIN C. – Induction of the *LIM* homeobox gene *Lmx1* by *WNT7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*, 1995, 83, 631-640.

17. COHN M.J., TICKLE C. – Limbs : a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *TIG*, 1996, 12, 253-257.
18. LAUFER E., NELSON C.E., JOHNSON R.L., MORGAN B.A., TABIN C. – *Sonic hedgehog* and *Fgf-4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 1994, 79, 993-1003.
19. NISWANDER L., JEFFREY S., MARTIN G.R., TICKLE C. – A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb [see comments]. *Nature*, 1994, 371, 609-612.
20. YANG Y., NISWANDER L. – Interaction between the signaling molecules *WNT7a* and *SHH* during vertebrate limb development : dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell*, 1995, 80, 939-947.
21. FRANCIS P.H., RICHARDSON M.K., BRICKELL P.M., TICKLE C. – Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, 1994, 120, 209-18.
22. FRANCIS-WEST P.H., ROBERTSON K.E., EDE D.A., RODRIGUEZ C., IZPISUA-BELMONTE J.C., HOUSTON B., BURT D.W., GRIBBIN C., BRICKELL P.M., TICKLE C. – Expression of genes encoding bone morphogenetic proteins and *sonic hedgehog* in talpid (ta3) limb buds : their relationships in the signalling cascade involved in limb patterning. *Dev. Dyn.*, 1995, 203, 187-197.
23. NISWANDER L., MARTIN G.R. – Mixed signals from the AER : *FGF-4* and *Bmp-2* have opposite effects on limb growth. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1993, 383B, 625-33.
24. NISWANDER L., MARTIN G.R. – *FGF-4* and *BMP-2* have opposite effects on limb growth. *Nature*, 1993, 361, 68-71.
25. HOGAN B.L. – Bone morphogenetic proteins : multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Dev.*, 1996, 10, 1580-1594.
26. ZOU H., NISWANDER L. – Requirement for *BMP* signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*, 1996, 272, 738-741.
27. GAÑAN Y., MACIAS D., DUTERQUE-COQUILLAUD M., ROSS M.A., HURLE J.M. – Role of *TGFβs* and *BMPs* as signals controlling the position of the digits and the reas of interdigital cell death in the developing chick limb bud. *Development*, 1996, 122, 2349-2357.
28. DUPREZ D., BELL E.J.D.H., RICHARDSON M.K., ARCHER C.W., WOLPERT L., BRICKELL P.M., FRANCIS-WEST P.H. – Overexpression of *BMP-2* and *BMP-4* alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.*, 1996, 57, 145-157.
29. ROBERTS D.J., JOHNSON R.L., BURKE A.C., NELSON C.E., MORGAN B.A., TABIN C. – *Sonic hedgehog* is an endodermal signal inducing *Bmp-4* and *Hox* genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development*, 1995, 121, 3163-3174.
30. HINCHLIFFE J.R., JOHNSON D.R. – The development of the vertebrate limb. An approach through experiment, genetics, and evolution, p. 273. In : Clarendon (ed.), (1980), Oxford.
31. MCGINNIS W., KRUMLAUF R. – Homeobox and axial patterning. *Cell*, 1992, 68, 283-302.
32. SCOTT M.P. – Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell*, 1992, 71, 551-553.
33. ZELSTER L., DESPLAN C., HEINTZ N. – *Hoxb-13* : a new hox gene in a distant region of the *HOXB* cluster maintains colinearity. *Development*, 1996, 122, 2475-2484.
34. DUBOULE D., DOLLÉ P., GAUNT S.J. – Les gènes du développement des mammifères. *La Recherche*, 1990, 219, 294-303.
35. DUBOULE D., DOLLÉ P. – The structural and functional organization of the murine *HOX* gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *Embo J*, 1989, 8, 1497-1505.
36. GRAHAM A., PAPALOPULU N., KRUMLAUF R. – The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell*, 1989, 57, 367-378.
37. DUBOULE D. – The vertebrate limb : a model system to study the *Hox/HOM* gene network during development and evolution. *Bioessays*, 1992, 14, 375-384.
38. NELSON C.E., MORGAN B.A., BURKE A.C., LAUFER E., Di MAMBRO E., MURTAUGH L.C., GONZALES E., TESSAROLLO L., PARADA L.F., TABIN C. – Analysis of *Hox* gene expression in the chick limb bud. *Development*, 1996, 122, 1449-1466.
39. YOKOUCHI Y., SASAKI H., KUROIWA A. – Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature*, 1991, 353, 443-5.
40. IZPISUA-BELMONTE J.C., BROWN J.M., CRAWLEY A., DUBOULE D., TICKLE C. – *Hox-4* gene expression in mouse/chicken heterospecific grafts of signalling regions to limb buds reveals similarities in patterning mechanisms. *Development*, 1992, 115, 553-60.
41. DOLLE P., DIERICH A., LE MEUR M., SCHIMMANG T., SCHUHBAUR B., CHAMBON P., DUBOULE D. – Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell*, 1993, 75, 431-441.
42. FROMENTAL-RAMAIN C., WAROT X., LAKKARAJU S., FAVIER B., H. HAACK, BIRLING C., DIERICH A., DOLLÉ P., CHAMBON P. – Specific and redundant functions of the paralogous *Hoxa-9* and *Hoxd-9* genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development*, 1996, 122, 461-472.
43. FAVIER B., RIJLI F.M., FROMENTAL-RAMAIN C., FRAULOB V., CHAMBON P., DOLLÉ P. – Functional cooperation between the non-paralogous genes *Hoxa-10* and *Hoxd-11* in the developing forelimb and axial skeleton. *Development*, 1996, 122, 449-460.
44. SMALL K.M., POTTER S.S. – Homeotic transformation and limb defects in *Hoxa-11* mutant mice. *Genes & Dev.*, 1993, 7, 2318-2382.
45. DAVIS A.P., CAPECCHI M.R. – Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *Hoxd-11*. *Development*, 1994, 120, 2187-2198.
46. FAVIER B., LE MEUR M., CHAMBON P., DOLLE P. – Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in *Hoxd-11* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 310-314.
47. DAVIS A.P., CAPECCHI M.R. – A mutational analysis of the 5' *HoxD* genes : Dissection of genetic interactions during limb development in the mouse. *Development*, 1996, 122, 1175-1185.
48. KONDO T., DOLLÉ P., ZÁKÁNY J., DUBOULE D. – Function of posterior *HoxD* genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development*, 1996, in press.
49. DAVIS A.P., WITTE D.P., HSIEH-LI H.M., POTTER S.S., CAPECCHI M.R. – Absence of radius and ulna in mice lacking *Hoxa-11* and *Hoxd-11*. *Nature*, 1995, 375, 791-795.
50. DUBOULE D., MORATA G. – Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.*, 1994, 10, 358-364.
51. ZÁKÁNY J., DUBOULE D. – Targeted deficiency in the *HoxD* complex : compound digit defects as a model for human synpolydactyly. *Nature*, 1996, 384, 69-71.
52. SHUBIN N.H., ALBERCH P. – Evolutionary biology, p. 319. In : HECHT M.K., WALLACE B., PRANCE G.I. (ed.), (1986), Plenum, New York.
53. DOLLE P., IZPISUA-BELMONTE J.C., FALKENSTEIN H., RENUCCI A., DUBOULE D. – Coordinate expression of the murine *Hox-5* complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature*, 1989, 342, 767-772.
54. IZPISUA-BELMONTE J.C., FALKENSTEIN H., DOLLE P., RENUCCI A., DUBOULE D. – Murine genes related to the *Drosophila AbdB* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *Embo J*, 1991, 10, 2279-2289.
55. YOKOUCHI Y., OHSUGI K., SASAKI H., KUROIWA A. – Chicken homeobox gene *Msx-1* : structure, expression in limb buds and effect of retinoic acid. *Development*, 1991, 113, 431-44.
56. YOKOUCHI Y., NAKAZATO S., YAMAMOTO M., GOTO Y., KAMEDA T., IBA H., KUROIWA A. – Misexpression of *Hoxa-13* induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. *Genes & Dev.*, 1995, 9, 2509-2522.
57. AHLBERG P.E., MILNER A.R. – The origin and early diversification of tetrapods. *Nature*, 1994, 368, 507-514.
58. AHLBERG P.E., CLACK J.A., LUKSEVICS E. – Rapid braicase evolution between Panderichthys and the earliest tetrapods. *Nature*, 1996, 381, 61-64.
59. THOROGOOD P. – Developmental patterning of the vertebrate limb, p. 347-354. In : HINCHLIFFE J.R., HURLE J.M., SUMMERBELL D. (ed.), (1991), Plenum : New York.
60. SORDINO P., VAN DER HOEVEN F., DUBOULE D. – Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. *Nature*, 1995, 375, 678-681.
61. DUBOULE D., SORDINO P. – From fins to limbs : Towards a molecular approach to the evolution of vertebrate paired appendages. *M S-Med. Sci.*, 1996, 12, 147-154.
62. MURAGAKI Y., MUNDLOS S., UPTON J., OLSEN B.R. – Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in *HOXD13*. *Science*, 1996, 272, 548-551.
63. MUENKE M., SCHELL U. – Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *TIG*, 1995, 11, 308-313.
64. YAMAGUCHI T.P., ROSSANT J. – Fibroblast growth factors in mammalian development. *Cur. Opi. Gen. Dev.*, 1995, 5, 485-491.