



Article scientifique

Article

1997

Published version

Open Access

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

Le contrôle de la morphogenèse des membres par les gènes *Hox*

Herault, Yann; Duboule, Denis

How to cite

HERAULT, Yann, DUBOULE, Denis. Le contrôle de la morphogenèse des membres par les gènes *Hox*.
In: Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales, 1997, vol. 191, n° 1, p.
21–27.

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:161726>

C. R. Soc. Biol., 1997, 191, 21-27.

**Le contrôle de la morphogenèse des membres
par les gènes *Hox***

The control of limb morphogenesis by *Hox* genes

par Y. HÉRAULT et D. DUBOULE

*Laboratoire d'Embryologie moléculaire et Morphogenèse,
Département de Zoologie et Biologie Animale,
Faculté des Sciences, Université de Genève, Science III,
30, quai Ernest-Ansermet, 1211 Genève 4, Suisse.*

(reçue le 30 janvier 1997).

Summary. — Vertebrate limbs are an amazing example of successful adaptation to various environmental conditions. In higher vertebrates, forelimbs help to fly, swim, walk, dig or grasp, yet their basic structure (the sequence and spatial arrangement of bony elements) is always the same. 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. 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. It is worth asking whether recent discoveries of important genes involved in these processes can bring novel arguments to the debate.

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 qu'à creuser et capturer, bien que leur structure de base (la séquence et l'arrangement spatial des éléments osseux) soit toujours la même. 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. 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. Aussi, est-il intéressant de se demander comment les découvertes récentes des gènes clés de ces processus peuvent apporter de nouveaux arguments pour éclairer cette question.

Chez les Vertébrés tétrapodes, les membres émergent du tronc sous la forme de bourgeons. Après quelques jours, le membre est presque formé et il présente une organisation quasi identique à celle du membre de l'adulte. On peut alors distinguer trois parties du plan d'organisation du membre. Le stylopode (bras ou cuisse) se situe de manière proximale. Ensuite, le zeugopode (avant-bras ou jambe) et enfin l'autopode (main ou pied) termine le membre. La transition entre ces deux niveaux d'organisation est contrôlée par la mise en place précoce de plusieurs régions fonctionnelles dans les bourgeons appendiculaires (6, 15). Ainsi, dans la partie terminale du bourgeon, on distingue la crête apicale ectodermique (AER), formée de cellules ectodermiques différenciées, qui maintient la prolifération des cellules mésenchymateuses, localisées en dessous, dans la « zone de progrès » (PZ). 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 (ZPA). Cette dernière possède la singulière capacité d'organiser la partie distale du bourgeon appendiculaire. Enfin ces trois régions interagissent avec l'ectoderme dorsal et ventral du membre. Par l'intermédiaire d'un réseau de facteurs sécrétés, ces régions vont permettre l'organisation du bourgeon appendiculaire suivant les trois axes de symétrie du membre (5, 15).

La croissance du membre résulte principalement des divisions cellulaires localisées dans la PZ. Après avoir quitté cette région au cours du bourgeonnement du membre, les cellules perdent leur capacité de croissance, se différencient, puis se condensent pour former des blastèmes. Ces condensations pré-cartilagineuses se diviseront par la suite, soit par branchement, soit par segmentation pour donner les différents éléments squelettiques. De manière surprenante, la croissance apicale et la modélisation des structures sont indissociables. C'est une des caractéristiques majeures de la morphogenèse des membres. Le membre se développe en suivant une progression proximo-distale, de telle sorte que le stylopode est modélisé avant l'avant-bras, lui-même produit avant la main. La morphogenèse du membre suit donc un processus progressif au cours duquel les parties tardives (distales) se développent après des structures déjà formées. Ce processus antéro-postérieur, progressif et unidirectionnel, liant prolifération et modélisation, dépend de l'activation précisément orchestrée des gènes architectes de la famille *Hox*.

Les 39 gènes *Hox* sont regroupés dans le génome des vertébrés en quatre complexes indépendants : *HoxA*, *B*, *C* et *D* (Fig. 1). Ils sont transcrits à partir du même brin d'ADN et codent pour des facteurs de transcription qui possèdent une région très conservée de liaison à l'ADN, nommée homéodomaine. Ces quatre groupes de gènes sont certainement apparus après des duplications successives d'un complexe ancestral unique, ressemblant à celui qui existe actuellement chez le Prochordé *Amphioxus* (12), ou scindé en deux chez la Drosophile. Comme conséquence de ces multiplications, les gènes, localisés à des

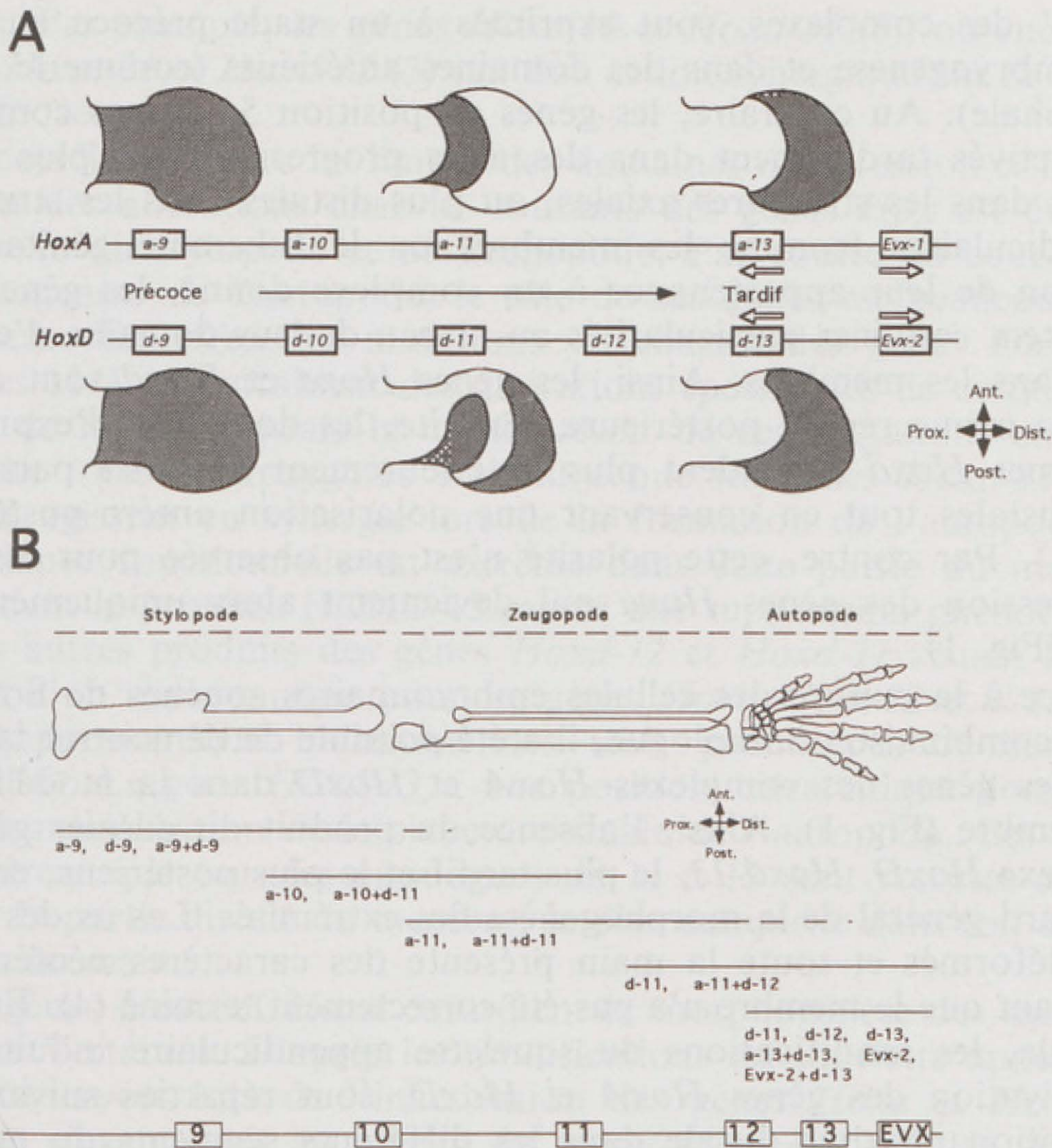


FIG. 1.

A. Les gènes architectes des membres. L'organisation structurelle des gènes paralogues 9 à 13 des complexes *HoxA* et *HoxD*. Tous les gènes *Hox* sont transcrits de droite à gauche. Les domaines d'expression de quelques-uns de ces gènes sont décrits (en gris) durant la formation de la main, au jour 11 du développement de la Souris. Dans le cas des gènes du complexe *HoxD* (par exemple *Hoxd-11*), leurs domaines d'expression ont une polarisation antéro-postérieure, absente chez les gènes *HoxA*.

B. 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 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* (9), *Hoxa-10* (8), *Hoxd-11* (2, 7), *Hoxd-12* (3, 11), *Hoxd-13* (4).

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. En effet, l'expression spatiale de ces gènes est réalisée séquentiellement, en suivant leur position sur le chromosome, dans des domaines de plus en plus restreints. Brièvement, les gènes, situés près de l'extré-

mité 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 certaines particularités au niveau de leur domaine d'expression dans les membres. Ainsi, les gènes *Hoxa* et *Hoxd* sont activés dans la même 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. 1). Par contre, cette polarité n'est pas observée pour les aires d'expression des gènes *Hoxa* qui deviennent alors uniquement distales (Fig. 1).

Grâce à la culture des cellules embryonnaires souches de Souris et à la recombinaison homologue, il a été possible de démontrer la fonction des gènes des complexes *HoxA* et *HoxD* dans la modélisation du membre (Fig. 1). Ainsi, 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 des doigts sont déformés et toute la main présente des caractères néoténiques, indiquant que le membre n'a pas été correctement terminé (4). En règle générale, les modifications du squelette appendiculaire induites par l'inactivation des gènes *HoxA* et *HoxD*, sont réparties suivant une orientation proximo-distale dans les différents segments du membre (*Hoxa-9*, *Hoxd-9* (9), *Hoxa-10* (8), *Hoxd-11* (2, 7), *Hoxd-12* (3, 11) et *Hoxd-13* (4)). Cette répartition s'effectue en fonction de la localisation de la limite proximale du domaine d'expression du gène muté et, par conséquent, de la position du gène au sein du complexe (Fig. 1). 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 (Fig. 1). De plus, des redondances de fonctions entre gènes paralogues ont été mises en évidence. Elles sont 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 (9). 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 (1). De même, la double-inactivation des gènes *Hoxa-13* et *Hoxd-13* conduit à l'arrêt de la formation de l'autopode (10). Cependant, la fonction d'un groupe de paralogues ne se borne pas à un seul segment du membre. En effet, il existe également des redondances fonctionnelles entre gènes non para-

logues. Par exemple, les gènes *Hoxa-10* et *Hoxd-11* (8), ou encore les gènes *Hoxa-11* et *Hoxd-12* (3) ont une action synergique sur la formation du zeugopode.

La corrélation entre les limites des domaines d'expression et la localisation des altérations chez les mutants des gènes *Hox* est évidente au niveau du stylopode et du zeugopode. Par contre au cours de la morphogenèse de l'autopode, le rôle de ces gènes est beaucoup plus complexe. En effet, les mutations de chacun des gènes *Hoxd* des groupes 11 à 13 entraînent des altérations spécifiques de certains éléments de la main. Mais la combinaison de ces mutations chez des animaux *trans*-hétérozygotes démontre que les gènes *Hoxd-11*, *d-12* et *d-13* agissent en synergie lors de la formation de l'autopode. La redondance fonctionnelle est extrême dans cette partie du membre. Cependant la protéine HOXD-13 exerce une suppression phénotypique sur les autres produits des gènes *Hoxd-12* et *Hoxd-11* : aussi le phénotype d'un triple mutant pour les gènes *Hoxd-11*, *d-12* et *d-13*, sera plus important que l'addition des trois phénotypes de ces trois gènes (16). Le gène *Hoxd-13* a une position hiérarchique dominante dans la modélisation de la structure finale de l'autopode. Ces études démontrent que tous les paralogues de 11 à 13 sont recrutés afin de définir la partie distale du membre, la plus complexe dans son organisation, la main.

Les gènes *Hoxa* et *Hoxd* contrôlent la morphogénèse des membres chez les Vertébrés. D'après les modifications du squelette appendiculaire, observées lors de l'inactivation des gènes *Hoxa* et *Hoxd*, ce contrôle s'exerce soit au niveau du recrutement des cellules pour les condensations des futurs cartilages, soit au niveau de la prolifération cellulaire. Par là même, les gènes *Hox* s'intègrent dans un nouveau schéma évolutionniste de la transition nageoire-membre dans lequel cette 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, de l'apparition d'une pièce supplémentaire et fondamentale, les doigts (14). 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, pourrait stimuler la prolifération tout en étant contrôlée par l'ectoderme. L'analyse des gènes correspondants chez d'autres espèces pertinentes aidera à choisir entre ces alternatives.

Récemment, Muragaki et coll. ont trouvé qu'une mutation dans le gène *Hoxd-13* est liée à un type de synpolydactylie (SPD) humaine (13).

Ceci démontre l'importance de ces protéines pour le développement d'une digitation normale. La SPD, ou syndactylie de type II (OMIN numéro 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. 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.

Dans cette mutation naturelle d'un gène *Hox*, les pièces du squelette qui sont affectées sont effectivement localisées au niveau des zones de fonction du gène *Hoxd-13*. Cependant le phénotype de cette mutation est plus important que celui du mutant homozygote de ce gène chez la Souris. En effet, le phénotype observé chez les patients atteints de la SPD est plus sévère que celui associé à la perte de fonction de *Hoxd-13* (4). L'analyse moléculaire a montré que des régions composées de répétitions de triplets, localisées en dehors de l'homéodomaine, ont été modifiées. Les répétitions de triplet forment des sites d'instabilité génétique dans plusieurs gènes responsables de maladies chez l'Homme. Pour la mutation SPD, c'est l'augmentation de la longueur d'une série de résidus alanine, codée par cette région, qui doit perturber la structure tridimensionnelle et la fonction de *HOXD-13*. Il est remarquable que le phénotype associé aux extrémités des patients souffrant du syndrome de synpolydactylie ressemble très fortement au phénotype obtenu chez des animaux ayant une triple inactivation des gènes *Hoxd-11*, *Hoxd-12* et *Hoxd-13*, réalisée dans notre laboratoire (17). Ceci suggère que la SPD humaine pourrait être causée par l'inactivation simultanée de plusieurs gènes *Hox*, probablement par la production d'une protéine *Hoxd-13* rendue dominante négative par la mutation. Dans un tel schéma explicatif, la protéine produite serait non seulement inactive mais de surcroît empêcherait, de par sa liaison à des séquences d'ADN cibles, l'activité des protéines HOX voisines, provoquant ainsi une perte de fonction de plusieurs protéines. Dans ce cas précis, il est notable que l'analyse des souris mutantes, ainsi que des années de travail sur la régulation de ces gènes, nous ont permis de proposer une base moléculaire à l'apparition du syndrome génétique humain, démontrant ainsi une fois de plus l'utilité de ces modèles animaux.

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 ses malformations en émergera.

Remerciements. — Le laboratoire d'Embryologie moléculaire et Morphogenèse est soutenu par le Fonds national suisse de la Recherche, le programme HFSPPO, le canton de Genève et les fondations Claraz et Latsis. Y. Hérault a été soutenu par des bourses de l'ARC et de l'EMBO.

BIBLIOGRAPHIE

1. 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.
2. Davis A. P. & Capecchi M. R., Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of *hoxd-11*. *Development*, 1991, 120, 2187-2198.
3. 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.
4. Dolle P., Dierich A., Schimmang T., Chambon P. & Duboule D., Disruption of the *Hoxd-13* gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell*, 1993, 75, 431-441.
5. Duboule D., The vertebrate limb: a model system to study the *Hox*/HOM gene network during development and evolution. *Bioessays*, 1992, 14, 375-384.
6. Duboule D., How to make a limb? *Science*, 1994, 266, 575-576.
7. 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.
8. 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.
9. Fromental-Ramain C. *et al.*, Specific and redundant functions of the paralogous *Hoxa-9* and *Hoxd-9* genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development*, 1996, 122, 461-472.
10. Fromental-Ramain C., Warot X., Messadecq M., LeMeur M., Dollé P. & Chambon P., *Hoxa-13* and *Hoxd-13* play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development*, 1996, 122, 2997-3011.
11. Kondo T., Dollé P., Zákány J. & Duboule D., Function of posterior *HoxD* genes in the morphogenesis of the anal sphincter. *Development*, 1996, 122, 2651-2659.
12. McGinnis W. & Krumlauf R., Homeobox and axial patterning. *Cell*, 1992, 68, 283-302.
13. Muragaki Y., Mundlos S., Upton J. & Olsen B. R., Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in *Hoxd-13*. *Science*, 1996, 272, 548-551.
14. 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.
15. Tickle C., Vertebrate limb development. *Cur. Opi. Gen. Dev.*, 1995, 5, 478-484.
16. Zákány J. & Duboule D., Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the *HoxD* complex. *Nature*, 1996, 384, 69-71.