

Des clusters de gènes HOX surnuméraires révèlent une duplication du génome chez les poissons

L'année 1998 a vu une petite révolution s'opérer parmi les biologistes concernés par l'évolution des vertébrés, et plus particulièrement au niveau du rôle des poissons comme modèle biologique en génétique comparative. Tout a commencé par la publication de travaux relatant l'existence de gènes *HOX* surnuméraires chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) par rapport aux mammifères [1]; ils montraient que, chez ce poisson, il y aurait d'autres *clusters* en plus de ceux normalement présents chez les autres vertébrés. Les gènes *HOX*, regroupés dans le génome de ces derniers en quatre *clusters* A, B, C et D, sont exprimés de façon colinéaire dans l'espace et le temps: les gènes antérieurs sont exprimés tôt et vers l'avant du corps embryonnaire, tandis que les gènes postérieurs sont exprimés plus tard et dans des régions distales du corps. Outre leur action sur le développement de l'embryon, une hypothèse couramment admise suggère qu'une augmentation de la complexité dans l'organisation des gènes *HOX* s'accompagne, au cours de l'évolution, d'une augmentation de la complexité au niveau de la morphologie de l'organisme. Par exemple, les invertébrés ne possèdent qu'un seul *cluster HOX* et montrent peu de diversité morphologique axiale, tandis que les tétrapodes en possèdent quatre et disposent d'une complexité axiale plus importante. Ces quatre *clusters* seraient apparus après deux duplications successives d'un *cluster* originel, chez un ancêtre commun des vertébrés actuels (figure 1, A→D). Afin d'essayer de déterminer l'ori-

gine et l'étendue des duplications ayant produit des copies surnuméraires chez les poissons, John Postlethwait (Eugene, OR, USA), Mark Ekker (Princeton, NJ, USA) et leurs groupes ont décidé d'étudier en détail l'organisation des gènes *HOX*

chez *D. rerio*. Présentés d'abord à un congrès sur l'évolution et la biologie cet été au Canada [2] et plus récemment dans un article publié dans *Science* [3], leurs résultats montrent que *D. rerio* possède sept *clusters* de gènes *HOX* au lieu de quatre chez les

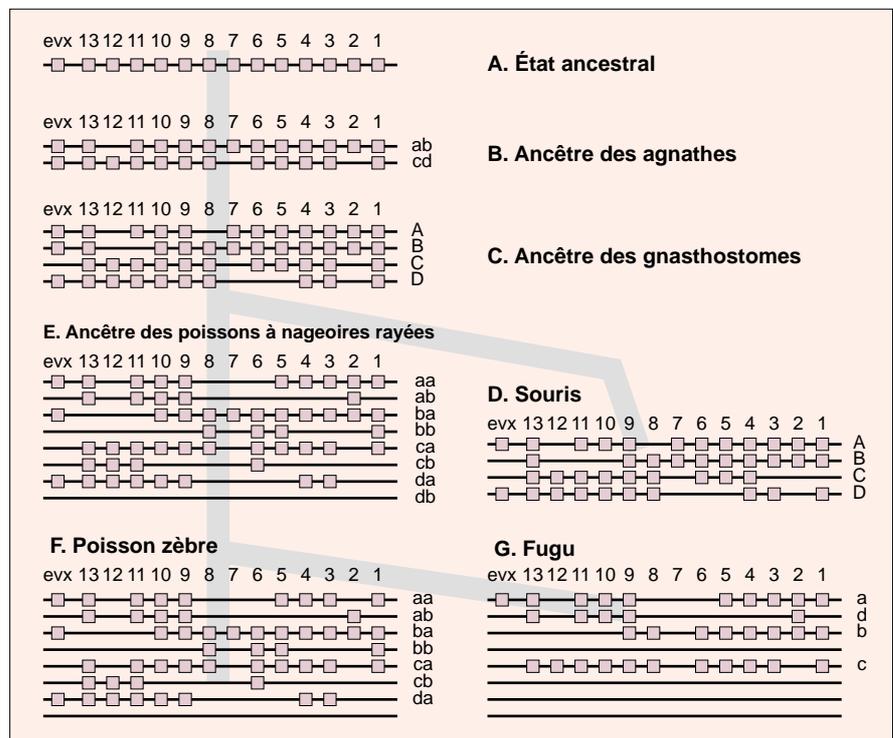


Figure 1. **Modèle cladistique retraçant l'évolution des clusters de gènes HOX chez les vertébrés.** (D'après [3].) En supposant que les pertes de gènes soient des événements plus fréquents que les gains, le stade ancestral (A) possédait 13 gènes HOX ainsi que le gène evx. Deux duplications successives ont donné 4 clusters chez l'ancêtre des vertébrés (C) pour atteindre, en perdant certains gènes au passage, le stade des tétrapodes actuels (D). Un poisson à nageoires rayées a subi une duplication supplémentaire (E) conduisant au poisson zèbre (F) et au Fugu (G), tout en s'accompagnant de pertes de gènes, certaines communes aux deux espèces, d'autres non.

S
E
T
E
M
O
U
V
E
L
L
E
S

autres vertébrés, et permettent d'expliquer une partie de l'évolution des *clusters* de gènes *HOX*. Mais, surtout, ces résultats montreraient que les *clusters* surnuméraires seraient bien la conséquence d'une troisième duplication du génome chez un ancêtre des poissons à nageoires rayées, il y a plus de 150 millions d'années (figure 1, E → F, G).

Angel Amores *et al.* [3] ont utilisé des amorces dégénérées pour amplifier par PCR les domaines à homéoboîte à partir de clones PAC de *D. rerio*, puis ont assemblé ceux-ci en *contigs* de clones chevauchants. Ils ont ensuite séquencé les régions codantes et réalisé des études phylogénétiques sur les gènes ainsi isolés. Sur 41 déjà identifiés chez les mammifères, 40 gènes homologues on pu être retrouvés. En outre, 7 nouveaux gènes *hox*, 1 pseudo-gène et le gène *evx1* ont également été identifiés. Ces différents gènes ont ensuite été assignés, par des analyses phylogénétiques, aux 13 groupes d'orthologie connus parmi les gènes *HOX* de vertébrés (figure 1, D). Les groupes 4 et 9 sont présents dans les 4 *clusters* de mammifères (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* et *HOXD*), et dans 4 *clusters* de *D. rerio*. La comparaison des séquences de ces derniers avec les séquences humaines a permis de montrer que ces 4 groupes étaient homologues un à un entre les deux espèces. Les auteurs en concluent que les deux premières duplications ayant engendré les 4 *clusters* de mammifères ont dû se produire avant la divergence des poissons à nageoires rayées et de ceux à nageoires lobées, c'est-à-dire il y a environ 420 millions d'années. En revanche, une analyse plus détaillée du groupe 6 a permis de montrer que 2 des 4 gènes de *D. rerio* appartenant à ce groupe sont orthologues du seul gène de mammifère *HOX6B*, et que les deux autres gènes de *D. rerio* sont orthologues du seul gène de mammifère *HOX6C*. De la même manière, en joignant la séquence des gènes appartenant aux groupes d'orthologie 9, 11 et 13, il a pu être montré que le *cluster* A est également dupliqué chez *D. rerio* ainsi que chez un autre poisson téléostéen, *Fugu rubripes*. Ce *cluster* serait d'ailleurs le seul à être dupliqué chez *F. rubripes*,

qui ne posséderait, outre les deux *clusters* A, qu'un seul exemplaire des *clusters* B et C, et aucun gène du *cluster* D. Ces *clusters* supplémentaires propres aux poissons seraient donc le résultat d'une troisième duplication, qui aurait eu lieu après la séparation entre la lignée des poissons à nageoires rayées et ceux à nageoires lobées, mais avant la séparation entre la lignée propre à *D. rerio* et celle propre à *F. rubripes*, c'est-à-dire entre 150 et 300 millions d'années.

En détaillant le contenu en gènes de chaque *cluster*, les auteurs ont pu retracer une partie de l'évolution des gènes *HOX* chez ces vertébrés. La présence et l'absence partagées de certains gènes entre deux espèces dans un *cluster* donné permettent, en effet, par une étude cladistique, de déterminer la séquence des événements de duplication (figure 1). Ainsi, l'absence de gènes du groupe 12 est une caractéristique commune des *clusters* A et B des tétrapodes et des poissons téléostéens, suggérant que ces *clusters* dérivent par duplication d'un proto-*cluster* «AB» existant chez leur ancêtre commun. De même, l'absence de gènes des groupes 2 et 7 est caractéristique des deux *clusters* C et D, ce qui indiquerait une origine commune. Une comparaison entre espèces plus proches montre que cette évolution est toujours en cours, car *F. rubripes* possède un gène que le *D. rerio* ne possède qu'en tant que pseudo-gène et qui est absent chez les mammifères. Inversement, plusieurs gènes actifs chez *D. rerio* sont des pseudo-gènes chez *F. rubripes* et sont absents chez les mammifères.

Il restait à savoir si ces duplications de *clusters* de gènes *HOX* correspondent à des événements locaux n'impliquant qu'eux-mêmes, ou si de grands segments de chromosomes (ou peut être des chromosomes entiers) étaient concernés. Pour y répondre, il a fallu identifier et cartographier les gènes avoisinant les *clusters* *HOX* chez *D. rerio* et rechercher s'il était possible d'observer une conservation de la relation de synténie entre ces gènes voisins des *clusters* *HOX* et les *clusters* eux mêmes, en passant d'une espèce à l'autre. Ces relations ont pu être mises en évi-

dence entre *D. rerio* et les mammifères, indiquant une duplication qui concernerait de grands segments du génome, et peut-être même le génome entier.

Les implications résultant de ces travaux dépassent donc largement le cadre des gènes *HOX* dans le développement embryonnaire. L'existence de *clusters* supplémentaires chez *D. rerio* n'est pas corrélée à une augmentation significative de la complexité phénotypique par rapport aux mammifères, ce qui tendrait à remettre en cause l'hypothèse d'un lien entre le nombre de *clusters* *HOX* et cette complexité morphologique. Cependant ces résultats ne remettent pas nécessairement en question leur influence possible sur l'évolution de la richesse morphologique des vertébrés. En effet, les spécialistes pencheraient maintenant pour un rôle au niveau de la diversification des formes rencontrées chez les poissons plutôt que de leur complexité au niveau d'un même organisme (les poissons à nageoires rayées constituent le groupe de vertébrés le plus diversifié, avec environ 25 000 espèces).

Les conséquences pour la génétique comparative sont également très importantes. Par exemple, le doublement du nombre de gènes dans le génome des poissons, à un moment donné de leur évolution, pourrait révéler des fonctions qui seraient restées cachées si leur étude avait été limitée au génome humain ou murin. En effet, une mutation létale dans un gène de mammifère possédant deux fonctions distinctes dans le développement embryonnaire annulerait les deux fonctions d'un coup. Il serait alors très difficile d'observer et à plus forte raison de comprendre le mécanisme d'action de tels gènes. J. Postlethwait et son groupe ont déjà pu montrer que, chez *D. rerio*, de telles fonctions peuvent être réparties chacune sur l'une des deux versions dupliquées du gène orthologue de mammifère, permettant ainsi leur étude séparée. Mais cette redondance pourrait aussi compliquer l'interprétation des études comparatives entre le génome des poissons et le génome humain. En principe, on pourrait s'attendre à ce que chaque gène humain possède

deux gènes homologues chez les poissons. L'inactivation d'un gène pourrait donc être en partie compensée par la seconde version du gène résultant de la duplication, ce qui masquerait les phénotypes mutants. Finalement, une troisième duplication du génome de *D. rerio* ayant eu pour conséquence un dédoublement du génome permettrait d'expliquer pourquoi, au cours de ces dernières

années, les généticiens trouvaient chez *D. rerio* de plus en plus de gènes sans homologues dans le génome de mammifère [4]. Ce serait une autre indication que le doublement du nombre de gènes aurait permis l'apparition de nouvelles fonctions, toutes potentiellement intéressantes pour expliquer le fonctionnement d'un organisme de vertébré.

H.R.C.

1. Prince VE, Joly L, Ekker M, Ho RK. Zebrafish hox genes: genomic organization and modified colinear expression patterns in the trunk. *Development* 1998; 125: 407-20.

2. Congrès annuel du *Canadian Institute for Advanced Research Program in Evolutionary Biology*, 25-29 juillet 1998.

3. Amores A, Force A, Yan YL, et al. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 1998; 282: 1711-4.

4. Wittbrodt J, Meyer A, Schartl M. More genes in fish? *BioEssays* 1998; 20: 511-5.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Les gènes *Hox* et la vie adulte de la glande mammaire.** Les gènes *Hox* contrôlent collectivement la régionalisation de l'embryon le long des grands axes. Chez les mammifères, qui possèdent 4 groupes de gènes *Hox* paralogues, ceux-ci coopèrent entre eux et avec les gènes *Hox* voisins d'une manière intégrée pour définir la position dans l'espace d'un organe ou d'une cellule selon un code combinatoire [1]. L'interprétation moléculaire est que les multiples gènes *Hox* concourent à moduler ensemble leurs gènes cibles en se liant à des éléments *cis*-régulateurs communs et que c'est l'intégration des signaux des multiples gènes *Hox* qui détermine l'activation finale des gènes cibles. Si le rôle des gènes *Hox* au cours du développement est assez bien compris, on en sait moins sur leur action ou sur leur extinc-

tion au cours de la vie adulte. Chen et Capecchi (Salt Lake City, UT, USA) en donnent un très joli exemple: ils montrent que la perte de fonction de trois gènes du groupe 9 (*Hoxa9*, *Hoxb9* et *Hoxd9*) (qui donne au cours du développement de sévères dysmorphies des membres) empêche le développement normal des glandes mammaires pendant et après la grossesse, entraînant un grave défaut de lactation [2]. L'article fait l'objet d'un commentaire au titre plein d'une saveur nostalgique: *No milk today (my Hox have gone away)* [3]. Le nombre des glandes, leur développement et leur morphologie sont normaux au cours de l'embryogenèse. C'est leur développement au cours de la grossesse qui ne se produit pas: le déficit en protéines *Hox9* s'accompagne d'une réduction de la prolifération cellulaire et

de la différenciation de la glande mammaire. On peut, réciproquement, imaginer que des mutations de ces gènes avec gain de fonction pourraient être impliquées dans certains carcinomes mammaires. La fonction des gènes *Hox9* peut être maintenue dans la glande mammaire après son extinction dans l'ensemble du mésoderme des flancs. Alternativement, leur expression sélective dans la glande mammaire pourrait être liée à l'émergence dans la glande mammaire d'un co-facteur commun à l'ensemble de ces gènes permettant ainsi leur expression concertée.

[1. Jacob F. *Med Sci* 1994; 10: 145-8.]

[2. Chen F, Capecchi MR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 541-6.]

[3. Duboule D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 322-3.]

Sixième NAT (Nantes/Actualités/Transplantation) 10-11 juin 1999 - NANTES (France) Targeting Recipient Immune Response through Bioreagents

- | | |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| B. Malissen | - Molecular interaction in first signal. |
| T. Strom | - Manipulation of allo-recognition through T-cell growth factor. |
| J. Thomas | - Tolerance induction using anti-CD3 immunotoxine antibodies. |
| L. Chatenoud | - Immuno-intervention through lymphocyte receptor targeting. |
| R. Zhong | - Prevention rejection and induction of tolerance by monoclonal antibodies against CD45RB. |
| J. Bluestone | - Second signals in allo and xeno-recognition. |
| D. Latine | - Immuno-intervention through CD2/LFA3 inhibition. |
| T.C. Pearson | - Manipulation of B7/CD28-CTL44 in primates. |
| S. Knechtle | - Inhibition of CD40 L pathway. |
| A. Wörn | - Engineering of scFv fragments for extracellular and intracellular applications. |
| B. Vanhove | - ScFv and intra-cellular bioreagents. |
| R. Dunbar | - HLA tetramers. |
| G. Grassy | - Computer-assisted rational design of immunosuppressive peptides. |
| N. Suci-Foca | - Altered Peptides <i>in vivo</i> . |
| F. Sanfilippo | - Inhibition of complement <i>in vivo</i> . |
| J.S. Pober | - Targeting second signals provided by vascular endothelial cells. |

Renseignements et formulaires d'Abstracts: NAT Secrétariat ITERT, CHU Hôtel-Dieu, 30, boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes (France). Fax: (33) 2 40 08 74 11. **Inscriptions:** 1 900 FF (déjeuners et dîners compris). Date limite de remise des abstracts: 1^{er} avril 1999.