

Contrôle des gènes Hox au cours du développement des vertébrés : apport de la transgénèse

Les gènes *Hox* des vertébrés sont les équivalents des gènes homéotiques des insectes, sur le plan de leur structure, de leur organisation en complexes et, dans une large mesure, de leurs fonctions. Il existe une colinéarité entre la disposition des différents gènes *Hox* d'un complexe donné, l'ordre chronologique de leur activation et le niveau de leur expression sur l'axe antéro-postérieur : les gènes situés les plus en 3' sont activés les premiers et leur limite d'expression est la plus antérieure. Cependant, l'essentiel de la spécificité temporelle et spatiale des différents gènes *Hox* semble indépendant de leur voisinage avec d'autres gènes *Hox* au sein d'un même groupe, ainsi que le démontrent les expériences de production de souris transgéniques dans lesquelles les régions régulatrices utilisées sont celles d'un seul *locus*. Il se pourrait toutefois que l'organisation colinéaire des gènes *Hox* fût nécessaire pour parfaire le contrôle temporel et spatial de leur expression, peut-être par l'intermédiaire de modifications progressives et directionnelles de la structure chromatinienne des différents complexes de gènes *Hox*.

Armand Renucci
Gilbert Urier
Matthieu Gérard
Denis Duboule

ADRESSE

A. Renucci : *enseignant chercheur*. G. Urier : *chercheur post-doctoral*. M. Gérard : *chercheur pré-doctoral*. D. Duboule : *professeur, directeur d'équipe de recherche*. Laboratoire européen de biologie moléculaire (EMBL), Meyerhofstrasse 1, Postfach 10.2209, 6900 Heidelberg 1, Allemagne.

m/s n° 2 vol. 9, février 93

Au cours du développement de la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*), une famille de gènes tient une place particulière : les gènes homéotiques. Une des fonctions de ces gènes est de donner une identité propre à chacun des segments (ou, plus précisément, des para-segments) résultant d'une phase de développement antérieure et, par conséquent, de déterminer la nature des structures produites par chaque segment (par exemple, une paire d'ailes ou de pattes). Les muta-

tions affectant de tels gènes ont pour effet de modifier l'identité d'un ou de plusieurs segments qui produisent alors des structures ne correspondant pas à celles que l'on trouve normalement à tel ou tel niveau antéro-postérieur de la mouche. Ainsi, une paire d'haltères (caractéristique du troisième segment thoracique) sera transformée en seconde paire d'ailes (caractéristique du second segment thoracique). De telles mutations sont appelées « homéotiques » puisque des structures ressemblant à des structures normales sont produites à de fau-

RÉFÉRENCES

- Gehring WJ. Homeo-boxes in the study of development. *Science* 1987 ; 236 : 1245-52.
- 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 : 1497-505.
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R. The murine and drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 1989 ; 57 : 367-78.
- Renucci A, Zappavigna V, Zákány J, Belmonte JC, Burki K, Duboule D. Comparison of mouse and human *HOX-4* complexes defines conserved sequences involved in the regulation of *Hox-4.4*. *EMBO J* 1992 ; 11 : 1459-68.
- Dollé P, Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein J, Renucci A, Duboule D. Coordinate expression of the murine *Hox-5* complex homeobox-containing genes during limb pattern formation. *Nature* 1989 ; 342 : 767-72.
- Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dollé P, Renucci A, Duboule D. Murine genes related to the *Drosophila* *AbdB* homeotic gene are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J* 1991 ; 8 : 2279-89.
- Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F. Sequential activation of *HOX2* homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 1990 ; 346 : 763-6.
- Tickle C, Albert BM, Wolpert L, Lee J. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 1982 ; 296 : 564-5.
- Izpisua-Belmonte JC, Tickle C, Dollé P, Wolpert L, Duboule D. Expression of the homeobox *Hox-4* genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* 1991 ; 350 : 585-9.
- Morgan BA, Izpisua-Belmonte JC, Duboule D, Tabin CJ. Targeted misexpression of *Hox-4.6* in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. *Nature* 1992 ; 358 : 236-9.
- Püschel AX, Balling R, Gruss P. Separate elements cause lineage restriction and specify boundaries of *Hox-1.1* expression. *Development* 1991 ; 112 : 279-87.

ses positions. Les gènes homéotiques de la mouche sont organisés en deux complexes, *Antennapedia* et *Bithorax* (ANT-C et BX-C), et leur caractérisation moléculaire a permis de cloner un ensemble de gènes codant pour des facteurs de transcription se liant à l'ADN par leur « homéodomaine ». Il s'agit d'un motif protéique de 60 acides aminés codé par une séquence d'ADN hautement conservée chez les métazoaires et appelée *homeobox* [1].

Localisation en complexes : conséquences pour la régulation

La conservation, pendant l'évolution, de cette séquence d'ADN a permis le clonage de gènes homologues chez de nombreux vertébrés (primates, ron-

geurs, oiseaux, amphibiens, poissons). Chez les mammifères, ces gènes (les gènes *Hox*) sont localisés sur quatre complexes (les complexes *HOX*), portés par différents chromosomes. Chaque de ces complexes contient de 8 à 10 gènes, et la comparaison des séquences des différents homéodomains permet d'aligner les complexes de la souris et de la drosophile, suggérant une conservation évolutive non seulement de ces gènes mais également de leur organisation structurale (figure 1). Ainsi, il apparaît qu'un complexe original aurait été amplifié à grande échelle, en parallèle à l'évolution du phylum conduisant aux vertébrés, alors que ce même complexe se serait scindé en deux parties au cours de l'évolution des arthropodes [2, 3]. L'expression de ces gènes durant le développement embryonnaire fournit un sens à cette conservation puisque,

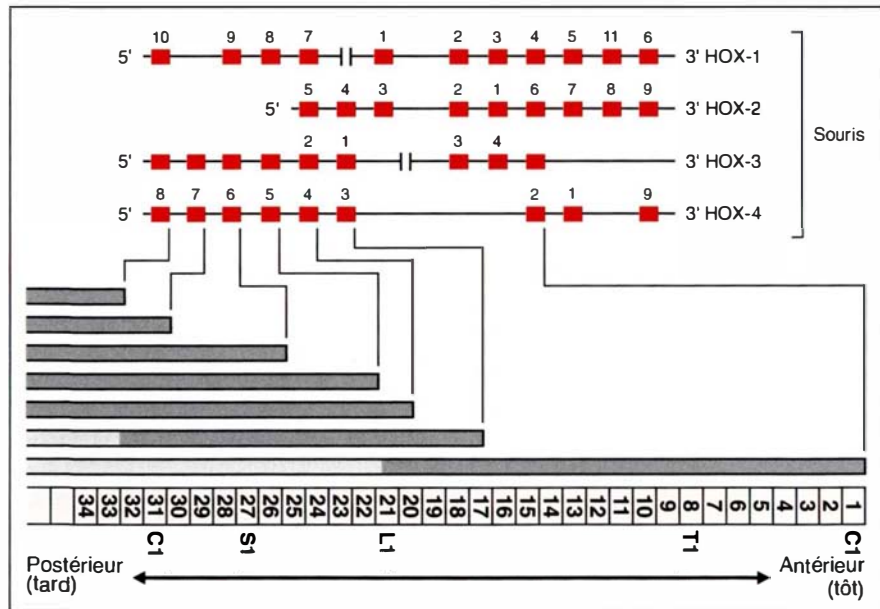


Figure 1. **Organisation des quatre complexes HOX chez la souris et niveau de la frontière d'expression dans la colonne vertébrale fœtale.** L'orientation des complexes 5'-3' correspond à la direction de transcription de tous les gènes *Hox* (représentés par les boîtes rouges) et l'alignement vertical des gènes appartenant à différents complexes définit un groupe de gènes paralogues. La colinéarité structurale est illustrée par leurs domaines d'expression dans les dérivés mésodermiques prévertébraux (C : vertèbre cervicale ; T : thoracique ; L : lombaire ; S : sacrée). La faible densité de points dans la région postérieure d'expression de *Hox-4.2* et *-4.3* indique une diminution du niveau d'expression sans qu'une frontière postérieure nette soit individualisée. Seules les frontières antérieures des domaines d'expression du complexe sont indiquées. Les frontières d'expression de gènes paralogues peuvent être légèrement différentes selon les complexes HOX considérés. Les gènes situés à droite (par exemple, *Hox-1.6*) sont exprimés plus tôt que ceux de la gauche (par exemple, *Hox-1.10*).

tant chez *Drosophila* que chez *Homo sapiens*, les gènes situés à une extrémité du (des) complexe(s) sont exprimés dans les structures antérieures de l'embryon, alors que les gènes situés à l'opposé ont des domaines d'expression postérieurs. Il semble donc que ces complexes supportent une représentation moléculaire de l'axe antéro-postérieur du corps. Cette notion de colinéarité structurale, préalablement observée chez la mouche par Ed Lewis lors d'une approche purement génétique, suggère, d'une part, que les mécanismes assurant la détermination des struc-

tures antéro-postérieures (A/P) de l'embryon ont été conservés au cours de l'évolution et, d'autre part, que l'organisation de ces gènes en complexes est nécessaire pour assurer la régulation de leurs expressions d'une façon correcte [2, 3]. La comparaison précise de l'organisation de ces complexes entre diverses espèces de vertébrés renforce leur importance potentielle dans la fonction de cette famille de gènes. En effet, une comparaison de l'organisation d'une partie du complexe *HOX-4* (au niveau des gènes *Hox-4.4* et *Hox-4.5*; voir figure 1) chez la souris, l'homme et

le poulet révèle une grande conservation, en particulier au niveau des séquences non codantes séparant les différentes unités de transcription [4]. En outre, il est à noter que tous les gènes d'un même complexe sont transcrits à partir d'un même brin d'ADN et, par conséquent, ont tous une direction de transcription identique.

Chez la souris et le poulet, l'analyse des domaines d'expression des gènes qui, au sein du complexe *HOX-4*, sont homologues au gène homéotique *Abdominal B (AbdB)* de la drosophile (c'est-à-dire *Hox-4.4*, *-4.5*, *-4.6*, *-4.7*

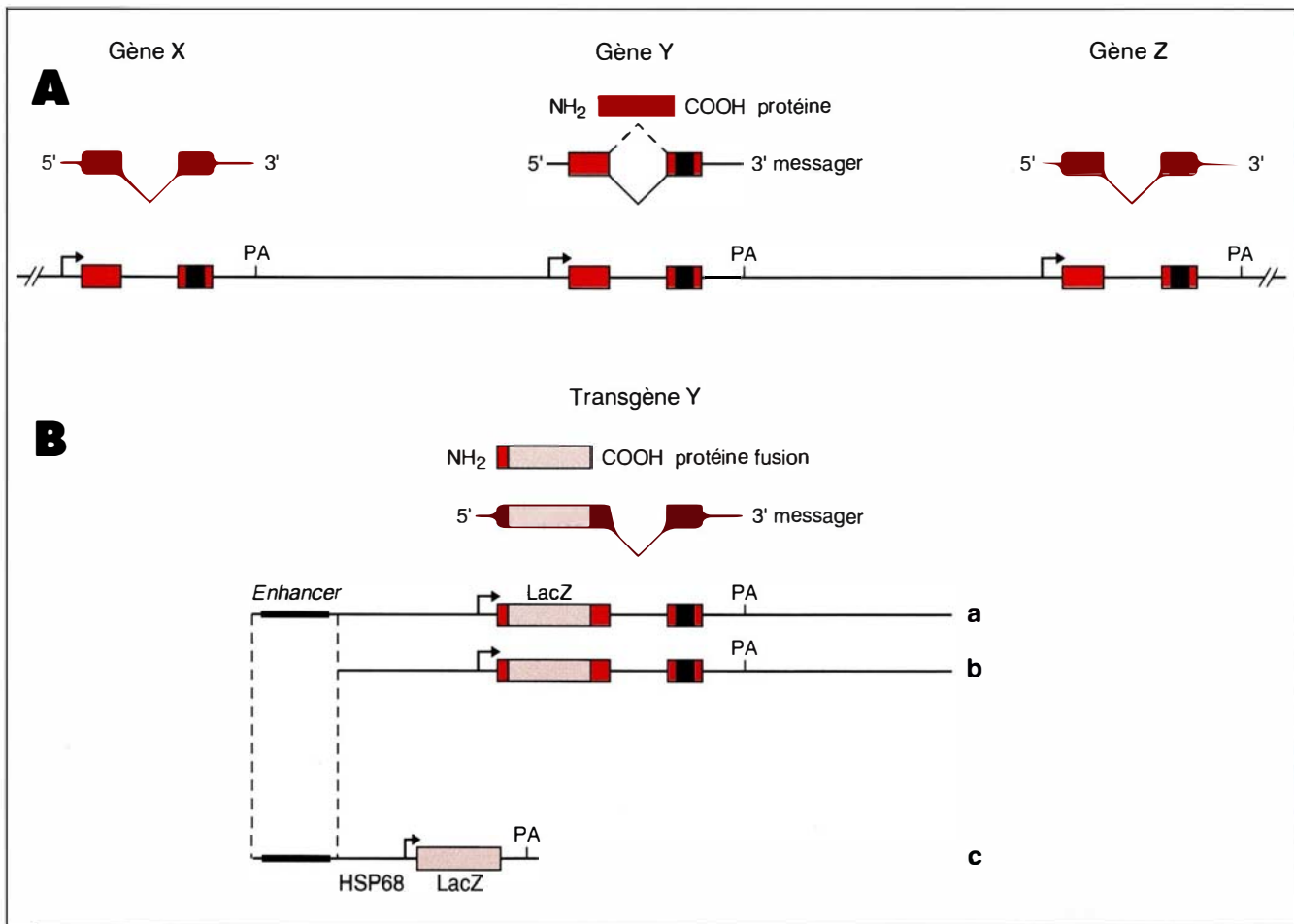


Figure 2. **A. Schéma de l'organisation des gènes Hox au sein d'un complexe.** Les gènes Hox (ici trois gènes X, Y et Z) ont typiquement deux exons (boîtes rouges) et l'homéodomaine, présent dans le deuxième exon, est en noir. Les flèches indiquent le démarrage de la transcription et PA, les sites de polyadénylation. Les transcrits produits ainsi qu'un exemple de protéine résultante sont indiqués au-dessus. **B. Structure d'un transgène hybride Hox/LacZ.** Typiquement, le transgène comprend l'unité de transcription et des séquences flanquantes (a). La partie codante du gène LacZ (bistre) est insérée en phase, ici dans le premier exon. Le transcrit et la protéine de fusion produites sont indiqués. Les propriétés d'une séquence régulatrice (dans ce cas d'un enhancer localisé en amont) sont analysées soit par délétion dans le transgène initial (b), soit par association avec un promoteur hétérologue assurant la transcription basale du gène LacZ (c).

RÉFÉRENCES

12. Whiting J, Marshall H, Cook M, *et al.* Multiple spatially specific enhancers are required to reconstruct the pattern of *Hox-2.6* gene expression. *Genes Dev* 1991 ; 5 : 2048-59.
13. Bieberich C, Utsch MF, Awgulewitsch A, Ruddle FH. Evidence for positive and negative regulation of the *Hox-3.1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 8462-6.
14. Sham MH, Hunt P, Noucher S, Papalopulu N, Graham A, Boncinelli E, Krumlauf R. Analysis of the murine *Hox-2.7* gene : conserved alternative transcripts with differential distributions in the nervous system and the potential for shared regulatory regions. *EMBO J* 1992 ; 11 : 1825-36.
15. Simeone A, Pannese M, Acampora D, D'Esposito M, Boncinelli E. At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 63-79.
16. Zákány J, Tuggle CK, Patel M, Nguyen-Huu MC. Spatial regulation of homeobox gene fusions in the embryonic central nervous system of transgenic mice. *Neuron* 1989 ; 1 : 679-91.
17. Tuggle CK, Zákány J, Cianetti L, Peschle C, Nguyen-Huu MC. Region-specific enhancers near two mammalian homeobox genes define adjacent rostrocaudal domains in the central nervous system. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 180-9.
18. Guthrie S, Muchamore I, Kuroiwa A, Marshall H, Krumlauf R, Lumsden A. Neuroectodermal autonomy of *Hox-2.9* expression revealed by rhombomere transposition. *Nature* 1992 ; 358 : 157-159.
19. Paro R. Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet* 1990 ; 6 : 416-21.
20. Gaunt SJ, Singh PB. Homeogenes expression patterns and chromosomal imprinting. *Trends Genet* 1990 ; 6 : 208-12.
21. Pearce JJH, Singh PB, Gaunt SJ. The mouse has a polycomb-like chromobox gene. *Development* 1992 ; 114 : 921-9.
22. Duboule D. The vertebrate limb, temporal colinearity and the *Hox/HOM* gene network. *BioEssays* 1992 ; 14 : 375-84.

et -4.8) montre que ces gènes sont activés d'une façon séquentielle dans les membres et la partie postérieure de l'embryon [5, 6]. Ainsi, *Hox-4.4* est exprimé quelques heures avant *Hox-4.5* et à partir d'un domaine légèrement plus antérieur que celui de *Hox-4.5*. Cette séquence temporelle suit donc l'ordre de ces gènes sur le complexe selon la relation : 3' tôt ; 5' tard. Cette colinéarité temporelle a été mise en relation avec la détermination progressive, le long de l'axe rostro-caudal, des structures embryonnaires chez les vertébrés, qui entraîne un décalage, dans le temps, entre la formation de notre « antérieur » et de notre « postérieur » (bien visible, par exemple, lors de la somitogenèse). L'importance de cette régulation séquentielle est indiquée par deux observations. D'abord, l'induction séquentielle de l'expression des gènes *Hox* humains par l'acide rétinoïque (dans sa forme tout-*trans*) dans des cellules de térato-carcinome en culture révèle également une activation progressive qui suit les positions relatives de ces gènes sur les complexes [7]. Ensuite, il s'avère que l'acide rétinoïque (qui semble jouer un rôle important durant l'embryogenèse des vertébrés) a un effet morphogénétique durant la spécification de l'asymétrie antéro-postérieure des structures de l'aile de poulet puisqu'il engendre, par application ectopique exogène, une duplication en miroir des structures distales [8]. Or, au cours d'une telle respcification du profil de développement, de manière analogue, les mêmes gènes *Hox-4* sont réactivés d'une façon séquentielle [9]. Cette expression coordonnée des gènes *Hox* homologues de *AbdB* dans le bourgeon de membre suggère une fonction importante dans la détermination des structures. Cette conclusion a été largement confirmée par de récents résultats concernant l'expression ectopique d'un tel gène (*Hox-4.6*) dans le bourgeon allaire, à l'aide d'un vecteur rétroviral [10]. La compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les phénomènes de colinéarité structurale et temporelle passe, entre autres, par l'analyse *in vivo* des séquences génomiques impliquées dans la régulation de ces gènes. De nombreux laboratoires ont donc

utilisé l'approche de la transgénèse chez la souris, et les principaux enseignements de ces travaux seront brièvement décrits.

Régulation des gènes *Hox* et transgénèse : les différentes stratégies

Les études structurales réalisées sur les gènes *Hox* montrent que chacun des *loci* correspond à une unité de transcription, définie par au moins un ARN messager codant pour une protéine. Cet ARN est pourvu de séquences non codantes de longueur variable tant en 5' qu'en 3'. Un *locus Hox* peut ainsi être défini en 5' par la terminaison du gène localisé en amont et en 3' par les séquences promotrices du gène localisé en aval (figure 2, p. 159). Deux approches impliquant la transgénèse sont généralement utilisées qui permettent l'étude soit des propriétés globales du *locus*, le gène rapporteur *LacZ* étant inséré à la place des séquences codantes (ou en phase avec elles), soit des propriétés spécifiques d'une séquence régulatrice potentielle en l'associant à un promoteur hétérologue contrôlant l'expression du même gène rapporteur. Dans le premier cas, le transgène codera pour une protéine de fusion, en utilisant l'ATG du gène *Hox* considéré et la terminaison de la protéine β -galactosidase. De telles constructions permettent, entre autres, d'analyser les séquences régulatrices situées en 5' et en 3' par une stratégie de délétions successives. Dans le second cas, c'est l'action individuelle de séquences particulières sur la transcription du gène rapporteur qui sont analysées. Dans tous les cas la présence de la protéine β -galactosidase est visualisée par coloration sur l'embryon total, une analyse histologique ultérieure restant toutefois possible.

Régulation individuelle ou collective ?

D'une façon générale, il semble qu'une unité de transcription *Hox* contenant des séquences flanquantes (à la fois en 5' et en 3') contient une information suffisante pour reproduire, dans des embryons transgéniques, une spécificité spatiale d'expres-

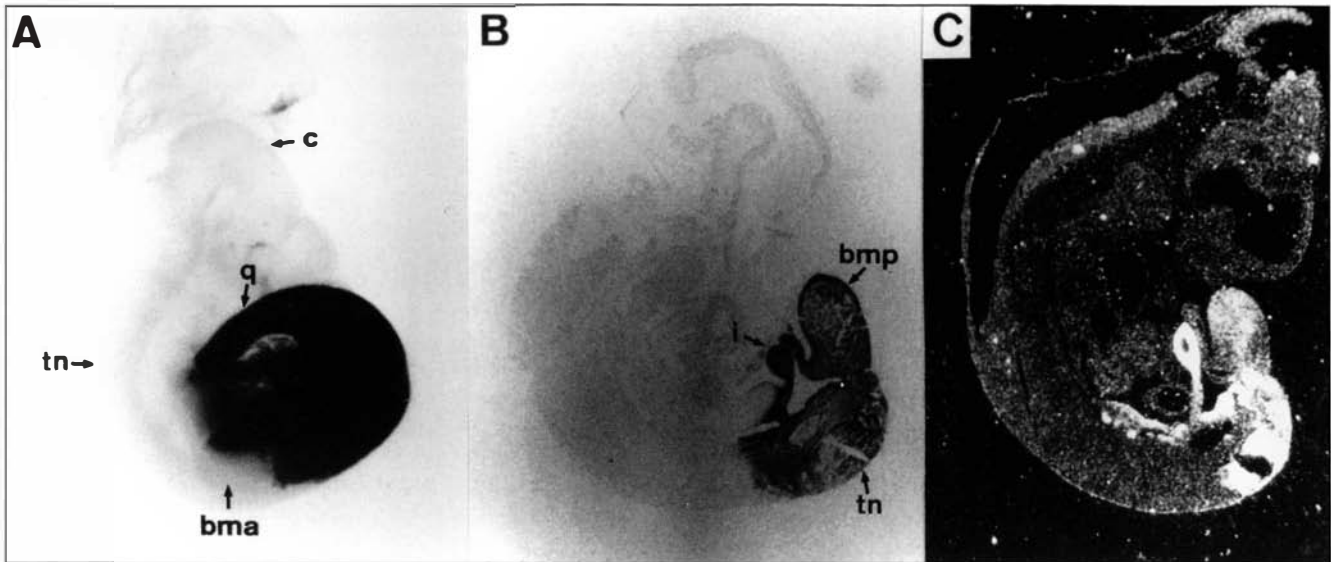


Figure 3. **A. Foetus transgénique exprimant une protéine de fusion Hox-4.4/ β -galactosidase.** Cette construction contient une séquence génomique comprenant le gène en entier, ainsi que des séquences en amont et en aval (p4.4LacZ [4]). La présence de la protéine de fusion est révélée par une coloration in situ (en sombre sur la photo). Le gène est exprimé dans une partie postérieure du fœtus, d'une façon relativement semblable au gène endogène. Cette ressemblance est illustrée par la comparaison entre une section histologique parasagittale d'un fœtus similaire (B) avec une section montrant l'expression du gène endogène Hox-4.4 par hybridation in situ à une sonde ARN radioactive (C). c : cerveau ; tn : tube neural ; q : queue ; bma : bourgeon du membre antérieur ; i : intestins ; bmp : bourgeon du membre postérieur.

sion relativement proche de celle du gène endogène correspondant, par exemple, les gènes *Hox-1.1* [11] et *Hox-4.4* [4] (avec des séquences flanquantes 5' et 3'), *Hox-2.6* (séquences 3') [12] ou *Hox-3.1* (séquences 5') [13]. La figure 3 montre la distribution de la β -galactosidase dans des fœtus âgés de 11 jours, transgéniques pour le gène *Hox-4.4*. Dans ce cas, le gène *lacZ* est inséré en phase dans le premier exon, engendrant ainsi une protéine de fusion. La position de la frontière d'expression le long de l'axe antéro-postérieur est proche de celle du gène endogène, et cela tant dans les tissus d'origine mésodermique (prévertèbres) que neuroectodermique (moelle épinière) ou dérivés de la crête neurale (ganglions des racines dorsales). Une section histologique selon un plan sagittal révèle que la distribution de la protéine de fusion *Hox-4.4*/ β -gal rappelle les spécificités tissulaires endogènes, par exemple en ce qui concerne la moelle épinière, les ganglions spinaux, le mésenchyme intestinal, le mésoderme latéral, le système uro-génital et les prévertèbres. Ainsi, plusieurs transgènes différents *Hox/LacZ* présentent des

limites d'expression à des niveaux variables qui correspondent à peu près aux niveaux d'expression des gènes endogènes. Il apparaît donc que, dans un certain nombre de cas, la régulation spatiale des gènes *Hox* soit relativement indépendante de leur présence dans un complexe.

Une intrication de séquences régulatrices

L'analyse détaillée des colorations obtenues pour divers transgènes montre néanmoins que la régulation spatiale n'est pas totalement conforme à celle du gène endogène, et cela pour un certain nombre d'aspects. Dans le cas de *Hox-4.4* (figure 3), la spécificité d'expression des transgènes dans les bourgeons de membre est perdue, remplacée par des expressions ectopiques obtenues de manière répétitive, excluant ainsi des effets de position*. D'autres différences sont observées de façon relativement récurrente, telles que de légères différences dans la

position de la frontière antérieure et une expression ectopique dans divers tissus, en particulier d'origine endodermique. Pour certains gènes comme *Hox-3.1*, une régulation spatiale correcte est observée jusqu'au milieu de la gestation, avant de diverger notablement de l'expression endogène. Pour quelques autres gènes *Hox* (par exemple *Hox-1.3* et un certain nombre de gènes du complexe *HOX-2*), cette même approche montre que leur *locus* (comme défini auparavant) contient une information ne permettant d'obtenir qu'un sous-ensemble des domaines d'expression, souvent très limité et accompagné par une expression ectopique importante du transgène.

Ces données suggèrent que des séquences régulatrices sont situées en dehors du *locus*, soit sur un *locus* voisin, soit à des distances plus grandes. Deux observations vont dans le sens de cette hypothèse. Tout d'abord, 2 kb de séquences correspondantes à la partie 3' non traduite (*trailer*) de l'ARNm du gène *Hox-3.2* permettent de réduire l'expression ectopique d'un transgène *Hox-3.1*, ce qui indique la présence d'une séquence régulatrice

* C'est-à-dire, des effets aléatoires liés à l'influence, sur l'expression du transgène, de séquences environnantes de l'ADN hôte, variant selon le site d'insertion.

sur le *locus* adjacent en amont [13]. Ensuite, deux cas ont été décrits relatant des recouvrements de plusieurs unités de transcription. Premièrement, une activité promotrice produisant un ARNm *Hox-2.7* est présente dans la séquence non traduite de *Hox-2.6* [14]. Deuxièmement, l'existence de séquences régulatrices situées au-delà des gènes avoisinants est fortement suggérée par l'existence d'un super-promoteur dans le complexe HOX3 [15]. Ce promoteur contrôlerait la transcription d'un ARN contenant trois homéodomains et qui pourrait produire différentes protéines après épissage alternatif. Ces contraintes structurales constituent une première explication possible à la conservation des gènes en complexes durant l'évolution. Il n'existe cependant pas de preuves formelles qu'une séquence régulatrice peut, *in vivo*, affecter la régulation de plusieurs gènes.

Une régulation de type modulaire

Faisant suite à l'étude de ces transgènes, la dissection fonctionnelle des séquences régulatrices a été entreprise. Les résultats obtenus jusqu'à présent semblent révéler deux types de séquences ayant des propriétés fonctionnelles différentes. Un premier type correspond à des séquences qui fournissent à la fois une spécificité tissulaire et une position de frontière antéro-postérieure correctes. Dans le cas de *Hox-2.6*, une séquence couvrant les deux exons et l'intron assure une spécificité d'expression dans le tube neural et les dérivés mésodermiques, alors qu'une autre séquence, couvrant 3 kb en 3' de la terminaison, assure une spécificité d'expression dans le tube neural [12]. Ces régions conservent leurs propriétés quand elles sont associées à un promoteur hétérologue, et cela indépendamment de leur position en 5' ou en 3' du promoteur (*figure 4*) [8]. Ces régions présentent donc des propriétés de type *enhancer*. Des séquences ayant de telles caractéristiques se retrouvent également dans les régions promotrices de *Hox-1.3* et *Hox-4.2*, où elles sont capables de diriger l'expression de protéines de fusion à des niveaux différents de la corde spinale

[16, 17]. D'une façon similaire, une séquence d'ADN dans le *locus Hox-2.9* est capable de contrôler sélectivement l'expression du transgène dans le rhombomère 4 (au niveau du futur cerveau postérieur) où le gène endogène est normalement exprimé [18]. Ces données suggèrent que des séquences régulatrices de type *enhancer spatial Hox* peuvent être les médiateurs d'une réponse colinéaire. Des régions contrôlant à la fois la frontière antéro-postérieure et les spécificités mésodermique et neuroectodermique ont été mises en évidence dans les séquences bordantes du *locus Hox-4.4* [4].

L'étude détaillée du *locus Hox-1.1* a révélé l'existence d'un promoteur minimal qui permet l'expression de la protéine de fusion dans l'ensemble de l'embryon [11]. L'addition d'une séquence située en 5' de ce promoteur minimal a pour effet de définir une frontière antéro-postérieure correcte, à la fois dans les dérivés mésodermiques et le système nerveux. Il est donc probable que cet élément gouverne la répression de l'activité du promoteur minimal dans la partie antérieure de l'embryon (*figure 4*). D'autres régions du *locus Hox-1.1* ont été identifiées qui répriment sélectivement ce promoteur, cela à différents stades du développement embryonnaire.

Dans leur ensemble, ces études suggèrent une grande hétérogénéité dans l'organisation des séquences régulatrices des gènes *Hox*. Certaines peuvent être localisées à l'extérieur des *loci* considérés, d'autres à l'intérieur, dans des séquences transcrites ou non transcrites. Dans certains cas, tel *Hox-3.1*, une partie importante de l'information est incluse dans des séquences situées en 5' du point de démarrage de la transcription et dans les séquences *leader*. A l'opposé, ces séquences peuvent être trouvées dans les exons et introns ou en aval de la terminaison (*Hox-2.6*). Deux gènes parmi les plus étudiés illustrent la difficulté de proposer un schéma cohérent de la régulation des gènes *Hox*. En effet, la régulation spatiale du gène *Hox-2.6* peut être largement reconstituée par la juxtaposition des activités d'*enhancers* spatiaux indépendants [12], alors qu'une des caractéristiques de la régulation de *Hox-1.1*

est l'activité séquentielle d'éléments répresseurs sur un promoteur minimal [11]. La localisation et les propriétés des séquences régulatrices des gènes *Hox* étudiés suggèrent pour l'instant qu'ils sont contrôlés, en partie, par des mécanismes indépendants.

Des complexes pour quoi faire

La connaissance de l'organisation structurale des régions régulatrices, obtenue grâce à l'analyse transgénique (combinée à d'autres approches structurales) est extrêmement importante lorsque l'on considère la (les) raison(s) d'être de tels complexes de gènes et leur phylogenèse. En effet, la dispersion de séquences régulatrices ou la mise en commun soit de séquences codantes, soit de séquences de type *enhancer* fournit une raison évidente à l'existence de structures en complexes. La caractérisation fonctionnelle *in vivo* de telles séquences pourrait passer par l'analyse, chez les embryons transgéniques, de l'expression de ces gènes au sein de mini-complexes par l'utilisation des chromosomes artificiels de levure (YAC). Les facilités de recombinaison dans ce système devraient permettre une approche relativement aisée. Dans le futur, l'utilisation en routine de la recombinaison homologue dans les cellules ES permettra une mutagenèse dirigée sur de telles séquences. Il est toutefois difficile de faire un lien entre cette organisation intriquée de séquences régulatrices et les bases moléculaires possibles des phénomènes de colinéarité structurale et temporelle. Cette remarque s'impose également lors de la comparaison des organisations fonctionnelles de ces complexes entre les mammifères et *Drosophila*. Il se pourrait donc que cet aspect ne représentât qu'une des raisons pour lesquelles cette structure en complexes a été conservée d'une façon si stricte pendant l'évolution.

Mémoire de l'expression et mesure du temps

Deux hypothèses (non exclusives l'une de l'autre) ont été avancées pour lier, par une relation de causalité, les phénomènes de colinéarité et

la structure en complexes des gènes *Hox*. Toutes deux impliquent des modifications progressives au niveau de la structure de la chromatine de ces complexes. La première est une extension des observations faites chez *Drosophila*, où un groupe de gènes, dont *Polycomb (Pc)* est le prototype, semble jouer un rôle dans la régulation de l'ensemble des gènes homéotiques [19]. Des complexes protéiques pourraient, en effet, se fixer au niveau de régions cibles et induire une structure différentielle et héritable de la chromatine. Le corollaire le plus simple est l'inactivation de l'expression de certains gènes par hétérochromatisation. Ce phénomène pourrait « suivre » les complexes HOX en fonction de la position des cellules sur l'axe antéro-postérieur. Par exemple, des cellules très postérieures auraient des complexes de gènes *Hox* dont la structure chromatinienne serait globalement relâchée

(on dit aussi ouverte), permissive pour la transcription, et donc exprimeraient la totalité des gènes présents alors que, dans des cellules antérieures, la plupart des gènes se verraient réprimés par l'extension du processus de compaction de la chromatine, c'est-à-dire de la formation d'hétérochromatine [20]. Des gènes de type *Pc* existent chez les vertébrés [21], et un système analogue pourrait donc fixer sur le plan moléculaire le degré d'ouverture de la chromatine au niveau des complexes *Hox* dans une lignée cellulaire précise, et ainsi représenter une réelle mémoire moléculaire de l'état d'activité d'un morceau de chromosome.

La seconde hypothèse propose que les complexes HOX sont utilisés pour contrôler le temps et la séquence d'activation des gènes *Hox*. Dans ce cas, la colinéarité temporelle serait le résultat d'une « ouverture » progressive, de 3' en 5', de la chromatine,

permettant aux gènes *Hox* devenus « accessibles » d'être transcrits de façon séquentielle pour autant que les facteurs appropriés soient présents [5]. Une telle hypothèse implique que les complexes HOX (donc un fragment d'ADN) pourraient être utilisés comme mesure du temps [22]. Il faut néanmoins mentionner que les résultats obtenus en transgénèse ne semblent pas en faveur de ces propositions puisque, apparemment, des transgènes isolés de leurs complexes sont à la fois activés de façon relativement correcte, et que leurs domaines d'expression sont souvent maintenus (mémorisés) au cours du développement. Il se peut que, dans les deux cas, des informations spécifiques à chaque gène existent, la structure en complexe n'étant requise que pour une harmonisation de ces différents contrôles individuels.

La lourdeur technique liée à la génération d'embryons transgéniques, les

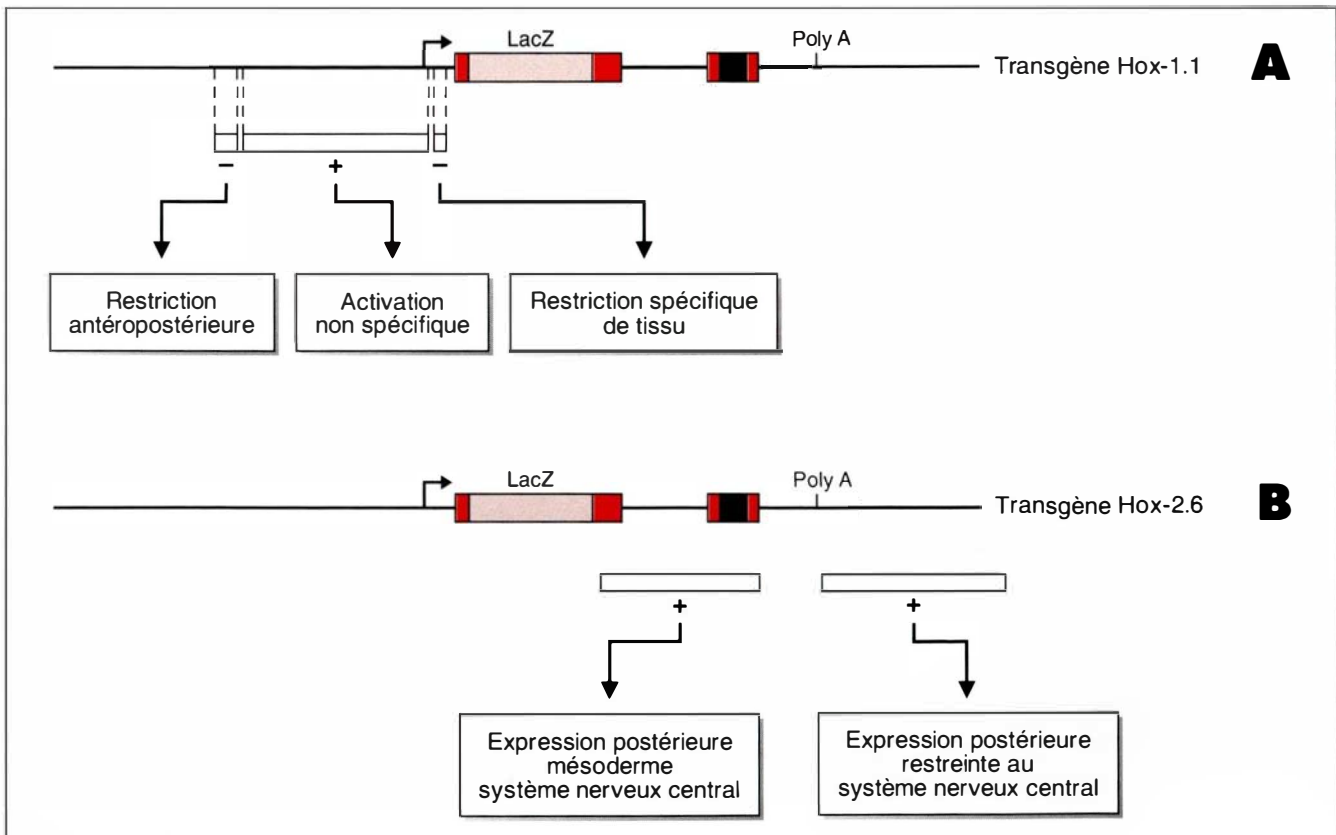


Figure 4. **Caractérisation de séquences régulatrices pour les gènes Hox-1.1 et Hox-2.6.** **A.** Une série de délétions dans les séquences en 5' du premier exon démontrent l'existence d'un promoteur minimal (+). L'activité de ce promoteur est indépendamment réprimée par deux courtes séquences (-), soit de manière spatiale (en 5'), soit de manière spécifique de tissu (en 3'). **B.** Deux régions présentant des propriétés d'enhancers spatiaux (+) ont été caractérisées par association avec un promoteur hétérologue.

effets de position qui limitent la répétitivité des phénotypes observés, et donc leur interprétation, associés aux problèmes intrinsèques de cette famille de gènes (leur structure en complexes qui en font des unités mi-individuelles, mi-collectives) rendent une approche systématique et précise difficile. Ces études montrent en tout cas qu'une partie importante de la régulation de ces gènes s'effectue en *trans* et ouvrent parfois la perspective de caractériser quelques-uns des facteurs impliqués dans le contrôle transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel de ces gènes. Cette recherche se doit cependant d'être complétée par différentes approches comme, par exemple, la comparaison de régions régulatrices entre différentes espèces afin d'identifier des séquences fonctionnelles (sites de fixation de facteurs agissant en *trans* sur l'ADN), qui sont évolutivement conservées, ou la recherche de régions régulatrices potentielles au niveau desquelles la conformation chromatinienne est relâchée, aboutissant à la constitution de sites hypersensibles à la désoxyribonucléase 1 (DNase 1). C'est par la combinaison de ces méthodes que l'on pourra parfaire notre connaissance des mécanismes de la régulation de l'expression des gènes *Hox*, essentiels à l'établissement de la forme chez les vertébrés ■

Remerciements

Nous souhaitons remercier les Drs. J. Zákány (EMBL, Heidelberg) et P. Dollé (LGME, Strasbourg) pour leur collaboration. Ce travail est soutenu par des fonds de l'EMBL, EMBO (G.U.) et HFSPO (A. R.).

TIRÉS A PART

D. Duboule.

Summary

Developmental regulation of *Hox* genes : the transgenic approach

In *Drosophila* and vertebrates, the specification of structures along the anteroposterior (A/P) axis is controlled by the expression of a family of regulatory proteins. These products are encoded by a set of clustered genes called homeotics (in insects) or *Hox* genes (in vertebrates). The structural and functional organization of these gene families is conserved ; genes located at one physical extremity of the complexes specify anterior structures whereas genes at the other end control posterior structures. In *Drosophila*, the regulatory mechanisms involved in the expression of the homeotic genes are partially understood. In vertebrates, the anterior part is determined before the posterior following a progressive rostro-caudal morphogenetic progression. During the process, *Hox* genes are sequentially activated according to their position in the cluster in the order : 3' early ; 5' late (the temporal colinearity). Both structural and temporal colinearities, as well as the high degree of interspecies conservation of the HOX clusters, indicate an important function of such a structural organization. The analyses of transgenic embryos containing a *Hox* transcription unit with flanking sequences suggest, however, that a rather correct spatial regulation can be achieved when such a gene is removed from the complex. DNA regulatory sequences located at various places within several *Hox* loci can either display autonomous activities, e.g. by controlling the position of A/P boundaries and the tissue specificity, or selectively restrict the activity of a minimal *Hox* promoter. Altogether, these data suggest that multiple mechanisms of regulation act on the HOX complexes and that most of them are mediated by factors, possibly shared by neighbouring *Hox* genes, acting in *trans*. Such a regulation could explain the « clustered evolution » of the *Hox* genes. Other possibilities are discussed.

La 3^e Conférence internationale sur la Régulation négative de l'hématopoïèse : des aspects fondamentaux à l'application clinique aura lieu du 18 au 22 avril 1993 à Paris. Elle est organisée par A. Najman, M. Guigon (INSERM), F. Lemoine, F. Isnard, J.-Ph. Laporte et N.-C. Gorin (CHU Saint-Antoine, Paris) et bénéficie, entre autres, du soutien de l'INSERM.

Comité scientifique international :

C. Bréchet (INSERM U.75, F.), H.E. Broxmeyer (USA), J. Caen (F.), N. Dainiak (USA), C. Eaves (Canada), B. Lowenberg (Pays-Bas), I. Pragnell (G.B.), A. Schechter (USA), P. Tambourin (INSERM/Institut Curie, F.), W. Vainschenker (INSERM U.91, F.), N. Young (USA), D. Zipori (Israël).

Programme :

Le programme comprendra des séances plénières, des communications orales et affichées sélectionnées sur résumé, suivies de discussions sur les thèmes suivants :

- récepteurs et leurs inhibiteurs : C. Dinaarello (USA), D. Gearing (USA), A. Lodish (USA), J. Pouyssegur (F.), F. Ruscetti (USA), J. Samarut (F.), J. Witzterbin (F.) ;
- inhibiteurs du cycle cellulaire : C. Bréchet (F.), M. Dorée (F.), J. Griffin (USA), M. Koury (USA), L. Kretzner (USA), J.-J. Lawrence (F.) ;
- approches moléculaires pour la manipulation des progéniteurs hématopoïétiques : A. Gewirtz (USA), M. Sanders (USA), W. Stratford May (USA) ;
- effets *in vitro* et *in vivo* des inhibiteurs de l'hématopoïèse : J. Banchereau (F.), H.E. Broxmeyer (USA), C. Carlo-Stella (Italie), N. Dainiak (USA), C. Eaves (Canada), M. Guigon (F.), Z. Han (F.), L. Pelus (USA), I. Pragnell (G.B.), P. Quesenberry (USA), P. Ralph (USA), D. Zipori (Israël) ;
- inhibition de l'hématopoïèse par les cellules leucémiques : M. Freedman (USA), B. Lowenberg (Pays-Bas), A. Najman (F.) ;
- virus et hématopoïèse par les cellules leucémiques ; M. Freedman (USA), B. Lowenberg (Pays-Bas), A. Nahman (F.) ;
- virus et hématopoïèse : E. Gluckman (F.), B. Torok-Storb (USA), N. Young (USA) ;
- protection de la moelle au cours de la radio - et chimiothérapie : C. Gorin (F.), M. Guigon (F.), M. Moore (USA), R. Neta (USA), W. Paukovits (Autriche), B. Sredni (Israël), M. Tubiana (F.), J. Zucali (USA).

Les actes de la conférence seront publiés dans la collection des Colloques de l'INSERM, sous forme d'une co-édition INSERM/John Libbey Eurotext.

Date limite de soumission des résumés pour communications orales ou affichées : 1^{er} février 1993

Pour tout renseignement complémentaire et inscription, s'adresser à Martine Guigon, Laboratoire d'Hématologie, CHU Saint-Antoine, 27, rue Chaligny, 75012 Paris • Télécopie : 40.01.14.99.