

## Contrôle moléculaire de la morphogenèse pulmonaire chez la souris

Savério Bellusci  
Alice de Maximy  
Jean-Paul Thiéry

La diversité des formes, qu'elles soient végétales ou animales, a longtemps été une source d'inspiration pour l'homme mais aussi un sujet d'interrogation pour le scientifique. Les biologistes du développement s'intéressent au processus de morphogenèse conduisant à l'établissement de structures ramifiées plus ou moins complexes. Les découvertes scientifiques réalisées au cours des dix dernières années ont permis d'établir qu'un nombre restreint de gènes, conservés au cours de l'évolution, était à l'origine de ce processus. Les produits de ces gènes sont généralement impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose. Le poumon embryonnaire de souris a servi de modèle pour caractériser les gènes jouant un rôle important dans la formation des ramifications et définir de quelle manière les produits de ces gènes collaborent entre eux pour agir sur les différents compartiments cellulaires afin de permettre l'élaboration d'une structure ramifiée.

**C**hez les vertébrés, la formation des ramifications est un événement majeur dans le développement de nombreux organes tels que le poumon, le pancréas, la glande mammaire, les reins ou la prostate. La structure de base à l'origine de ces différents organes est un simple bourgeon, constitué de cellules épithéliales, plus ou moins indifférenciées, entourées de mésenchyme. Au cours du développement embryonnaire, ce tube épithélial s'allonge et se ramifie pour donner naissance à une structure tridimensionnelle arborée. Des expériences désormais

classiques d'embryologie ont montré que la formation des ramifications à partir de ce tube épithélial nécessite des interactions entre les compartiments épithélial et mésenchymateux. A ce jour, les molécules de signalisation impliquées dans ces interactions dynamiques et réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme sont très peu connues. Nous avons utilisé le poumon embryonnaire de souris comme modèle afin de mieux comprendre les mécanismes de base régissant la morphogenèse des organes vertébrés ramifiés et d'identifier ses bases génétiques et moléculaires.

### ADRESSES

S. Bellusci: chargé de recherche à l'Inserm. A. de Maximy: étudiante en thèse. J.P. Thiéry: directeur de recherche au Cnrs. UMR144-Cnrs, Institut Curie, Laboratoire de morphogenèse cellulaire et progression tumorale, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

### TIRÉS À PART

S. Bellusci.

## Le développement embryonnaire du poumon

Le développement embryonnaire du poumon commence à 9,5 jours *post-coïtum* (jpc). Ce développement se traduit par l'apparition d'un bourgeon à partir de l'épithélium de l'endoderme de l'intestin antérieur. A ce stade, le poumon est donc constitué d'un épithélium monostatif entouré de mésenchyme d'origine splanchnique. Très rapidement, ce bourgeon primaire s'allonge et se ramifie pour donner, à 10,5 jpc, une structure composée d'une trachée et de deux bourgeons secondaires (figure 1A). Les facteurs permettant la détermination du territoire pulmonaire le long du tube digestif ainsi que la stimulation précoce de la prolifération de l'épithélium et son bourgeonnement sont encore inconnus. Les gènes *Hox* constituent une

famille de gènes potentiellement impliqués dans cette phase initiale du développement pulmonaire ainsi que dans les phases ultérieures de morphogenèse [1-3]. Il est important de mentionner que les profils de ramification des bourgeons secondaires droit et gauche sont très différents. Cette asymétrie est probablement mise en place dès la formation du bourgeon primaire. Il a été montré récemment que la perte de fonction de *Lefty-1* (*m/s* 1999, n° 3, p. 417), un membre de la famille des TGF $\beta$  et du récepteur IIb de l'activine conduisaient à une isomérisation du poumon [4, 5]. Chez la souris, le bourgeon gauche donne naissance à un lobe unique tandis que le bourgeon droit va engendrer quatre lobes distincts. Le patron de ramification de chaque lobe peut être suivi avec précision jusqu'à 12,5 jpc et est hautement reproductible d'un embryon à l'autre. La formation des ramifica-

tions lors du stade pseudoglandulaire (9,5 à 16,5 jpc) se produit selon deux mécanismes différents (figure 1B). Dans le premier cas, il y a croissance d'un bourgeon primaire sur une certaine distance puis apparition de bourgeons secondaires latéraux situés à une distance donnée par rapport à la partie la plus distale du bourgeon primaire. Ce type de ramification contribue à établir la longueur et la forme globale de chaque lobe. Dans le deuxième cas, un bourgeon secondaire se forme à partir de la partie la plus distale du bourgeon primaire donnant ainsi naissance à deux ramifications, chacune d'elle continuant à croître dans un axe différent. Le développement pulmonaire résulte de la mise en place de ces deux types de ramifications. Plus tard, au cours de la phase canaliculaire (16,6 à 17,4 jpc) et sacculaire (17,4 jpc à la naissance), les bourgeons terminaux vont se dilater pour former des structures en forme de sac. Une division de ces sacs en compartiments (les futures alvéoles) va ensuite avoir lieu [6].

## Les interactions épithélium-mésenchyme sont essentielles lors du développement pulmonaire

Des expériences d'embryologie expérimentale, menées par Alescio et Casini en 1962, ont permis de mettre en évidence le rôle majeur joué par le mésenchyme dans la formation des bourgeons pulmonaires [7]. Dans ces expériences, des morceaux de mésenchyme distal sont greffés à proximité de l'endoderme de la trachée, dénudée au préalable de son mésenchyme proximal. Des bourgeons ectopiques sont alors observés au niveau de la trachée qui, normalement, ne donne jamais de bourgeons latéraux *in vivo*. A l'inverse, une inhibition de la formation des ramifications est observée lorsque le mésenchyme proximal est placé au contact de l'endoderme distal [8]. La formation ectopique de bourgeons à partir de la trachée est aussi possible lorsqu'un filtre est placé entre le mésenchyme distal et l'épithélium proximal, indiquant ainsi que le mésenchyme distal sécrète des facteurs solubles capable d'agir sur

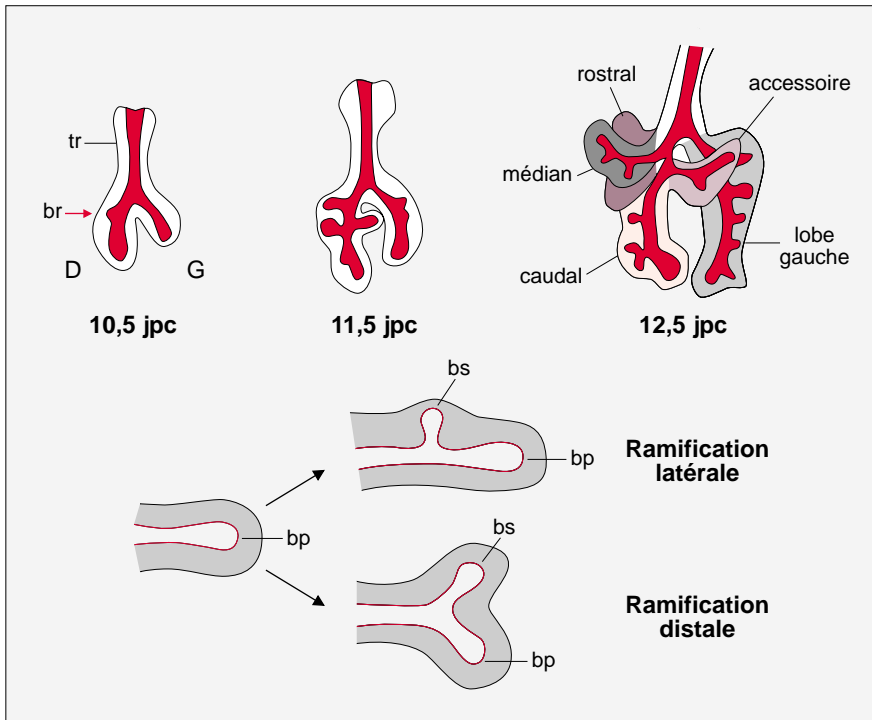


Figure 1. **Morphogenèse du poumon de souris. A.** Développement embryonnaire du poumon de souris. À 10,5 jours post-coïtum (jpc), le poumon est constitué d'une trachée (tr) et de deux bronches (br). L'ébauche d'un bourgeon latéral est déjà observable dans la bronche droite (flèche rouge) (D). À 11,5 jpc et 12,5 jpc, le poumon subit un processus de ramification important aboutissant à la formation de 4 lobes à droite (appelés lobes rostral, médian, accessoire et caudal) et un lobe unique à gauche. **B.** Lors du développement pulmonaire, deux types de ramifications sont observées. Les bourgeons secondaires (bs) apparaissent soit latéralement (ramification latérale), soit distalement (ramification distale) par rapport au bourgeon principal (bp).

l'endoderme ou/et sur la couche basale pour changer le comportement cellulaire [9].

Des découvertes récentes ont permis d'identifier plusieurs gènes exprimés à très haut niveau dans l'épithélium ou dans le mésenchyme distal. Les produits de ces gènes sont bien évidemment de bons candidats pour jouer un rôle dans le contrôle de la formation des ramifications.

### Plusieurs classes de gènes sont exprimées dans le poumon embryonnaire

Les gènes auxquels nous nous sommes intéressés sont particulièrement conservés au cours de l'évolution. La plupart ont été tout d'abord identifiés chez la drosophile sur la base de mutations affectant l'axe dorso-ventral, la polarité des segments ou encore le développement de certains organes internes tels que le système respiratoire. Les homologues murins de ces gènes ont été identifiés. Il s'agit, entre autres, de membres de la famille des TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) dont les BMP, *bone morphogenetic protein*, constituent une sous-famille [10], des FGF (*fibroblast growth factors*), de Wnt [11] et de Hedgehog (Hh). La technique d'hybridation *in situ* sur organe entier en utilisant des sondes ARN antisens marquées par la digoxygénine a été largement utilisée pour établir le profil d'expression spatial des gènes d'intérêt (figure 2). Dans le poumon embryonnaire, plusieurs classes arbitraires de gènes ont pu ainsi être identifiées selon leur localisation. Les gènes de classe 1 comprenant, entre autres, *Bmp4*, *Shh* et *Wnt7b* [12], sont essentiellement exprimés dans l'endoderme distal. A l'inverse, les gènes de classe 2 sont exprimés dans le mésenchyme distal situé immédiatement autour des bourgeons épithéliaux. *Patched* (un récepteur à SHH), *Wnt2* et *Fgf10* [12-14] appartiennent à cette deuxième catégorie. Enfin, les gènes de classe 3 ont un profil d'expression beaucoup plus large, et les transcrits correspondant à ces gènes sont retrouvés à travers tout le mésenchyme et/ou l'endoderme. Deux des trois gènes de la famille *Gli* (*voir plus loin*) appartiennent à cette catégorie.

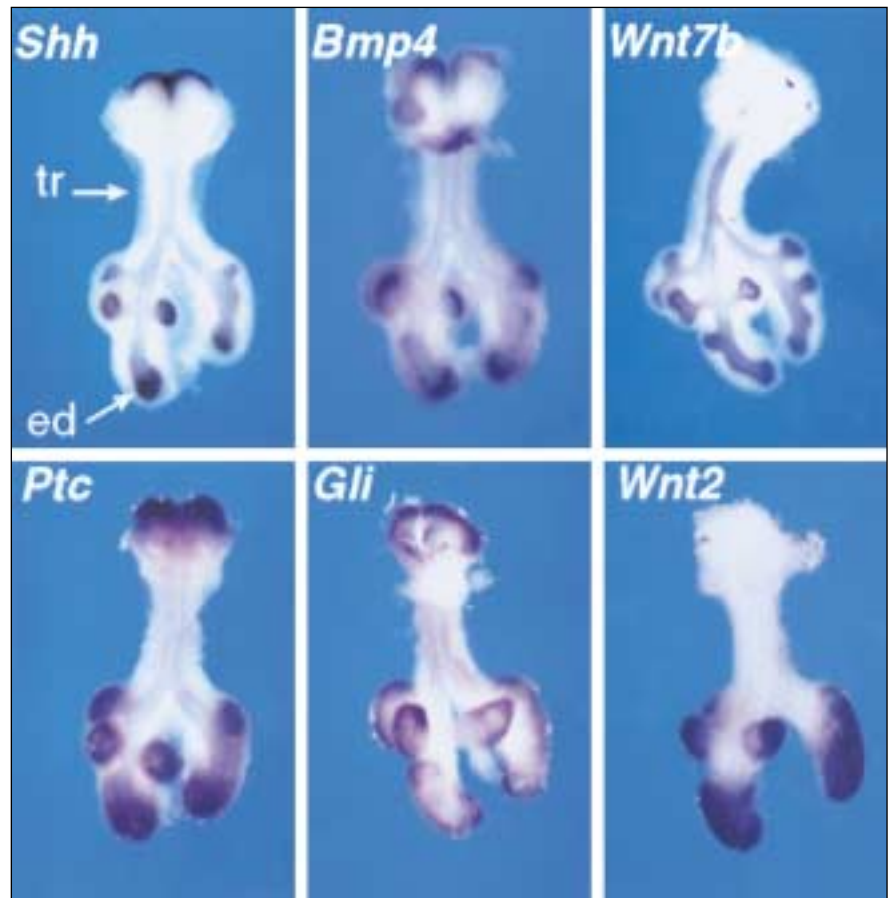


Figure 2. **Quelques exemples d'expression de gènes de classe 1 (*Bmp4*, *Shh* et *Wnt7b*) et de classe 2 (*Gli*, *Ptc* et *Wnt2*) dans le poumon de souris à 11,5 jpc.** Hybridation *in situ* sur poumon entier avec des sondes ARN antisens marquées par la digoxygénine. Il faut remarquer le haut niveau d'expression de *Bmp4*, *Shh* et *Wnt7b* dans l'épithélium distal (*ed*) par rapport à la trachée (*tr*).

Ces profils d'expression suggèrent que les bourgeons distaux, qui subissent un processus important de morphogenèse, agissent comme des centres organisateurs contrôlant localement la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire, avec des facteurs sécrétés par l'endoderme agissant sur le mésenchyme et inversement. Plusieurs approches complémentaires ont été effectuées pour étudier le rôle de ces gènes *in vivo*: (1) surexpression dans des embryons transgéniques en utilisant un promoteur spécifique de l'endoderme pulmonaire distal; (2) inactivation par recombinaison homologue dans les cellules embryonnaires souches ou par mutations spontanées; enfin (3) la fonction de leurs produits a été directement testée sur des cultures organotypiques de poumon embryonnaire.

### Bone morphogenetic protein 4 inhibe la prolifération de l'épithélium pulmonaire

*Bmp4*, exprimé à très haut niveau dans l'épithélium distal, est aussi détecté à des niveaux beaucoup plus faibles dans le mésenchyme adjacent [12]. Ce profil d'expression suggère que ce gène pourrait être impliqué dans la morphogenèse pulmonaire. Malheureusement, les embryons homozygotes pour une mutation dans le gène *Bmp4* meurent trop tôt pour que l'on puisse étudier le développement du poumon [15]. Dans l'attente de pouvoir réaliser une inactivation spécifique de *Bmp4* dans le poumon embryonnaire, des embryons transgéniques surexprimant *Bmp4* sous le contrôle du promoteur

de la protéine de surfactant humaine de type C (SPC) ont été obtenus [16]. Ce promoteur a été maintes fois utilisé pour surexprimer spécifiquement un gène dans l'épithélium pulmonaire distal. Il permet d'exprimer un transgène dès 10 jpc avec un niveau d'expression augmentant de façon considérable à 15 jpc, au moment de la différenciation des cellules épithéliales pulmonaires. Les poumons transgéniques surexprimant *Bmp4* sont plus petits que les poumons normaux pris au même stade. Cette diminution de taille est accompagnée par une diminution de la prolifération de l'épithélium pulmonaire, une augmentation de l'apoptose dans le mésenchyme et une inhibition partielle de la différenciation des pneumocytes de type II [12]. Ce résultat suggère donc que BMP4 agirait comme un régulateur négatif de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales

### **Sonic hedgehog induit la prolifération du mésenchyme pulmonaire**

*Shh*, dont les transcrits sont détectés à travers tout l'épithélium pulmonaire, est fortement exprimé au niveau distal [17]. *Patched*, le gène codant pour un récepteur de SHH est exprimé majoritairement dans le mésenchyme, suggérant que ce compartiment cellulaire représente la cible principale de SHH (voir figure 2) (*m/s* 1997, n° 3, p. 402). La surexpression de *Shh* dans l'épithélium distal nous a permis d'élucider le rôle de cette molécule de signalisation au cours du développement pulmonaire. Les souriceaux transgéniques nouvellement nés meurent à la naissance à la suite d'une insuffisance respiratoire [13]. L'analyse des poumons révèle une augmentation importante de la prolifération des cellules mésenchymateuses résultant en des poumons plus petits et très compacts par rapport aux poumons normaux pris au même stade de développement. Par ailleurs, dans ces poumons transgéniques, la différenciation de l'épithélium respiratoire et bronchique semble normale. Quels sont les gènes contrôlés par SHH dans le poumon? En accord avec les résultats précédemment établis chez la drosophile,

nous avons aussi montré que la transcription de *Patched* est augmentée dans les poumons surexprimant *Shh*. Chez la drosophile, Hh induit la transcription de *patched* via un facteur de transcription à doigt de zinc appelé cubitus interruptus (Ci). Il existe trois homologues vertébrés de *ci* appelés *Gli*, *Gli2* et *Gli3*. Ils sont tous trois exprimés dans le mésenchyme pulmonaire [18]. Il est apparu que l'expression de *Gli*, mais pas celle de *Gli2* ou *Gli3*, était réglée positivement dans les poumons transgéniques [18]. Récemment, l'inactivation de *Shh* et de *Gli2-Gli3* chez la souris a montré que ces gènes jouaient un rôle-clé dans le développement précoce du poumon [18-20]. Chez les embryons homozygotes pour une mutation dans le gène *Shh*, l'œsophage et la trachée sont fusionnées et le poumon ne forme que quelques bourgeons. Alors que les mutants simples *Gli2<sup>-/-</sup>* et *Gli3<sup>-/-</sup>* présentent une diminution du nombre de bourgeons, les doubles mutants *Gli2<sup>-/-</sup>/Gli3<sup>-/-</sup>* montrent un phénotype pulmonaire beaucoup plus sévère et analogue à celui des embryons chez lesquels le gène *Shh* a été inactivé.

Chez la drosophile, l'orthologue de *Shh*, hedgehog (*hh*), est capable d'induire l'expression de décapentaplégic (*dpp*) qui est l'orthologue de *Bmp2/Bmp4* chez les vertébrés [21]. Alors que les preuves expérimentales de l'induction de l'expression de *dpp* par Hh ne manquent pas, il n'y a que peu de données concernant l'induction des *Bmp* par SHH. Chez l'embryon de poulet, *Bmp2* est induit dans le mésenchyme antérieur du bourgeon de membre en réponse à une expression ectopique de SHH [22]. Par ailleurs, l'expression ectopique de SHH induit l'expression de *Bmp4* dans le mésenchyme de l'intestin antérieur [23]. Malgré ces évidences expérimentales, nous avons montré que l'expression de *Bmp4* n'est pas augmentée dans les poumons surexprimant *Shh* [13]. Par ailleurs, l'expression de *Shh* n'est pas altérée dans les poumons transgéniques surexprimant *Bmp4* [12]. Les résultats obtenus nous ont donc permis de conclure que les voies de signalisation de SHH et de BMP4 agissent indépendamment l'une de l'autre au cours de l'ontogenèse pul-

monaire. En revanche, notre étude sur le rôle de FGF10 dans le développement pulmonaire montre que SHH pourrait contrôler l'expression de *Fgf10* [14]. Ainsi, SHH affecte non seulement l'état de prolifération du compartiment mésenchymateux mais aussi l'expression de gènes spécifiques du mésenchyme tels que *Patched*, *Gli* et *Fgf10*.

### **Le fibroblast growth factor 10 est associé à la croissance directionnelle des bourgeons**

L'expérience de Alescio et Cassini en 1962 avait établi qu'un ou plusieurs facteurs d'origine mésenchymateuse étaient capables d'induire la formation ectopique de bourgeons à partir de la trachée. L'expression d'une version dominante négative du récepteur FGFR2-IIIb dans l'épithélium pulmonaire distal (en utilisant le promoteur SPC) altère considérablement la morphogenèse pulmonaire. Les souriceaux meurent à la naissance, le poumon transgénique est alors composé d'une trachée et de deux bronches principales sans aucune ramification latérale [24]. Cette expérience révèle un rôle déterminant pour certains FGF dans la morphogenèse pulmonaire. La question s'est donc posée de savoir quels sont les FGF impliqués *in vivo*. FGFR2-IIIb lie FGF1, FGF7 et FGF10 avec une forte affinité. Cependant, à 11,5 jpc, lorsque le poumon est déjà ramifié, seul FGF10 est exprimé [14]. FGF1 et FGF7 ne sont exprimés que plus tardivement (respectivement 13,5 et 14 jpc). Il apparaît que FGF10 est la molécule de signalisation dont le profil d'expression est corrélé à la formation des ramifications. *Fgf10* est exprimé de façon dynamique dans la partie du mésenchyme située juste au-dessus des bourgeons en formation (figure 3). Il est à noter que cette expression diminue lorsque les bourgeons ont atteint une certaine longueur, *Fgf10* est alors exprimé à une certaine distance de l'épithélium distal, dans le mésenchyme situé entre les bourgeons. Cette observation suggère que FGF10 joue un rôle dans la croissance directionnelle des bourgeons. La fonction de FGF10 dans la formation des ramifications a été tes-

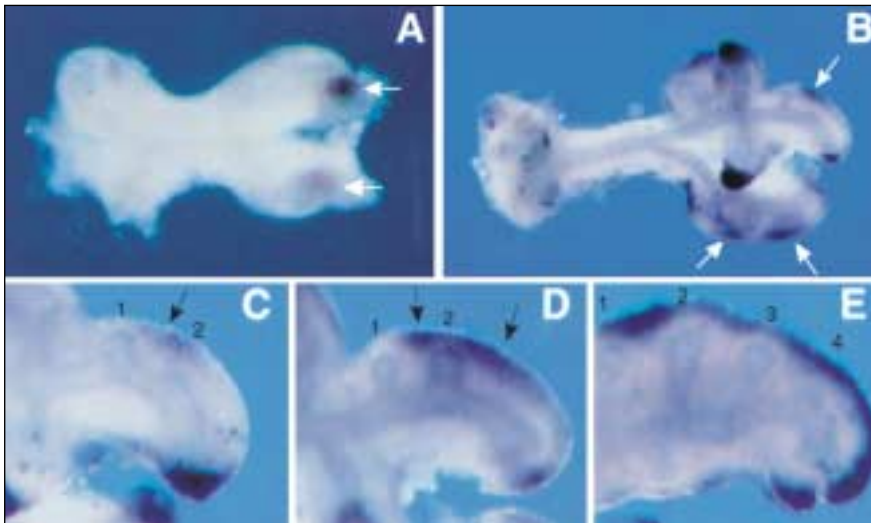


Figure 3. **Expression dynamique de Fgf10 au cours de la morphogenèse pulmonaire.** **A.** Fgf10 est exprimé dès 10,5 jpc dans le mésenchyme distal des deux bronches (flèches noires). **B.** À 11,5 jpc, Fgf10 est exprimé dans des régions spécifiques du mésenchyme. Cette expression est associée avec la formation de bourgeons (les flèches blanches indiquent les régions où Fgf10 est faiblement exprimé). **C-E.** Expression de Fgf10 pendant la formation des ramifications latérales du lobe caudal droit (de 11,5 à 12,2 jpc, photos prises à 8 heures d'intervalle). Le profil d'expression de Fgf10 semble indiquer un rôle dans la croissance directionnelle des bourgeons. Les numéros indiquent la position des bourgeons se formant latéralement.

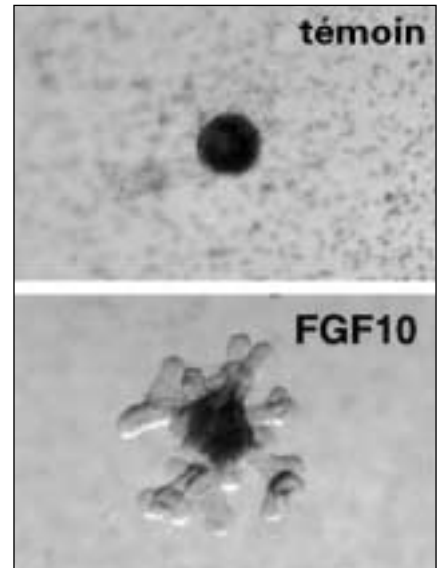


Figure 4. **Effet de FGF10 sur de l'épithélium pulmonaire purifié cultivé dans du Matrigel.** Après 48 heures de culture, l'épithélium cultivé en absence de FGF10 (**A**) forme une sphère compacte alors qu'en présence de FGF10 (**B**) des ramifications primaires et secondaires sont observées.

tée sur des explants d'épithélium pulmonaire embryonnaire de souris (figure 4). En l'absence de FGF10, l'explant témoin forme une structure sphérique compacte après 48 heures de culture. En présence de FGF10, la formation de ramifications primaires et secondaires est alors observée. Cette formation de ramifications est la résultante d'une augmentation de la prolifération de l'épithélium.

La preuve définitive concernant le rôle-clé de *Fgf10* dans la morphogenèse pulmonaire a été récemment fournie. Les souriceaux nouveau-nés chez lesquels le gène *Fgf10* a été inactivé meurent à la naissance avec une absence complète de membres et un système respiratoire presque inexistant [25, 26]. Contrairement au phénotype observé dans les poumons transgéniques exprimant la forme dominante négative FGFR2-IIIb, il n'y a pas de formation de bronches, seule la trachée est présente. SHH règle-t-il l'expression de *Fgf10*?

Lors de la formation des membres chez le poulet, SHH contrôle positivement l'expression de *FGF4*, *FGF8* et *FGF10* [27, 28]. Contrairement à ce qui était attendu, l'expression de

*Fgf10* est réglée négativement dans les poumons transgéniques surexprimant *Shh* [14]. De plus, dans les poumons dans lesquels le gène *Shh* a été inactivé, l'expression de *Fgf10* est retrouvée dans le mésenchyme en contact direct avec l'épithélium. Ainsi, au cours du développement pulmonaire, SHH serait plutôt un régulateur négatif de l'expression de *Fgf10* [29]. Il serait tentant de penser que SHH, sécrété par l'épithélium, puisse agir différemment en fonction de la concentration, des concentrations modestes réglant positivement l'expression de *Fgf10* et des concentrations fortes, l'inhibant. Ce modèle reste cependant à confirmer.

### Un orthologue murin du gène de drosophile sprouty est exprimé dans le mésenchyme pulmonaire

La morphogenèse du système respiratoire de la drosophile est un excellent modèle pour pouvoir identifier de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle de la formation des ramifications. Au cours du développement

embryonnaire de la drosophile, il apparaît 10 paires de placodes trachéales, toutes dérivées de l'ectoderme et situées de chaque côté de l'embryon. Ces placodes, constituées d'environ 80 cellules, se ramifient de façon stéréotypique pour donner 6 ramifications primaires constituées chacune de 3 à 20 cellules. Contrairement à ce qui se produit au cours du développement du poumon chez les vertébrés, la formation de ces ramifications chez la drosophile se fait essentiellement par un processus de migration cellulaire. La cellule la plus distale au niveau de chaque ramification primaire va ensuite envoyer des prolongements cytoplasmiques (ramifications secondaires). La formation de ces ramifications primaires et secondaires est principalement sous le contrôle de deux gènes, *branchless* et *breathless*, codant respectivement pour une protéine sécrétée de la famille des FGF et pour son récepteur à activité tyrosine kinase [30, 31]. Alors que *breathless* est exprimé de façon homogène par toutes les cellules trachéales, *branchless* est exprimé par certains groupes de cellules entourant la pla-

code aux endroits précis vers lesquels les futures ramifications vont se diriger. Il est clair maintenant que Branchless est impliqué dans la croissance directionnelle des ramifications primaires et secondaires et que FGF10, précédemment cité, représente son orthologue direct du point de vue fonctionnel. Récemment, un nouveau mutant du système respiratoire de la drosophile a été caractérisé. Il a permis d'identifier le gène *sprouty*, impliqué dans le contrôle des ramifications secondaires à partir des cellules les plus distales [32]. Dans le mutant, les cellules latérales adjacentes aux cellules les plus distales forment aussi des extensions cytoplasmiques. Des analyses génétiques et moléculaires montrent que Sprouty inhibe l'effet de Branchless sur les cellules adjacentes. *sprouty* code pour une protéine d'environ 60 kDa avec un domaine caractéristique riche en cystéine qui est conservé d'une espèce à l'autre. Sprouty possède un peptide signal pour la sécrétion mais la protéine est retrouvée essentiellement liée à la membrane [32]. Il est possible que Sprouty soit ensuite clivée à l'extérieur de la cellule par une enzyme qui reste à identifier.

Une publication récente de Casci *et al.* [33] montre cependant que, contrairement à ce qui était proposé par Hacohen *et al.* [32], Sprouty n'est pas une protéine sécrétée mais une protéine intracellulaire, liée à la membrane qui agirait en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase en inhibant la voie Ras.

Nous avons récemment identifié, par criblage des banques de données EST de GenBank, trois orthologues murins du gène de drosophile *sprouty* [34]. Nous avons choisi de travailler plus particulièrement sur un de ces gènes, appelé *Sprouty4* parce qu'il est différent des trois gènes humains connus à ce jour [32]. Le profil d'expression de *Sprouty4* au cours du développement embryonnaire est corrélé à un rôle potentiel en tant qu'inhibiteur de la voie de signalisation de FGF. Dans le poumon embryonnaire, *Sprouty4* est exprimé exclusivement au niveau du mésenchyme pulmonaire.

Nous nous proposons dans le futur d'étudier le rôle potentiel de SPROUTY4 dans la morphogénèse

pulmonaire. Notre hypothèse de travail est que SPROUTY4 pourrait limiter l'effet prolifératif résultant de l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase, en particulier les récepteurs des FGF, au niveau des compartiments mésenchymateux et/ou épithéliaux.

La fonction des différents membres vertébrés de la famille SPROUTY reste à définir. Il est possible que, contrairement à ce qui est observé chez la drosophile (chez laquelle Sprouty inhibe les voies de signalisation induites par l'activation des récepteurs tyrosine kinase, EgfR, *Breathless* et *Torso*), les différents membres vertébrés agissent en inhibant des voies de signalisation spécifiques. Une publication toute récente de Tefft *et al.* [35] semble confirmer cette hypothèse. Les auteurs ont montré que, chez l'embryon de souris, *Sprouty2* était exprimé dans l'épithélium pulmo-

naire distal. L'inactivation *in vitro* de l'expression du gène *Sprouty2* dans le poumon embryonnaire de souris, en utilisant des oligonucléotides antisens, conduit à une augmentation de 80 % du nombre de ramifications distales (par rapport à une série de poumons témoins ou de poumons cultivés en présence d'oligonucléotides sens). Bien que le mécanisme d'action de SPROUTY2 soit encore à identifier, cette augmentation du nombre de bourgeons distaux pourrait être la conséquence d'une activité plus élevée de FGF10.

### Vers un modèle moléculaire intégré de la formation des ramifications

La formation des ramifications comprend généralement trois phases, la phase de croissance du bourgeon, l'arrêt de la prolifération et la forma-

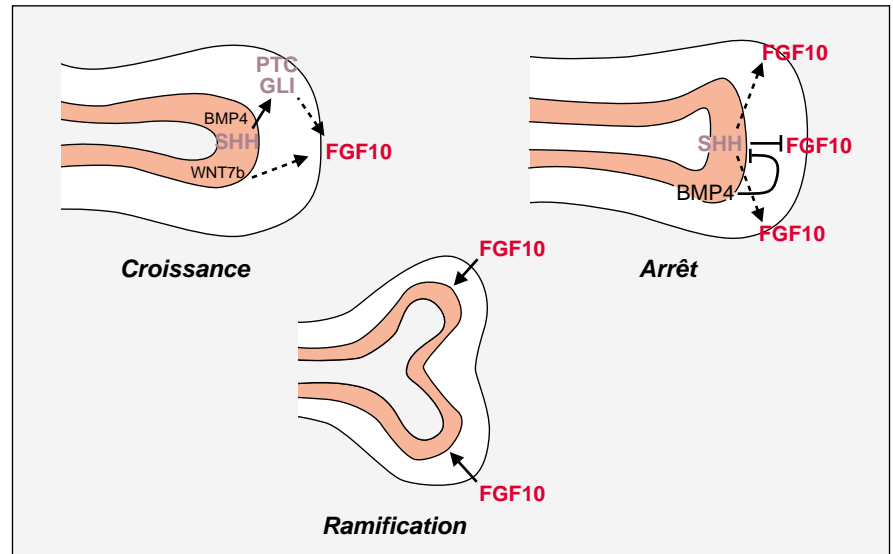


Figure 5. **Modèle proposé pour la formation des ramifications distales.** Trois phases sont observées : (1) la phase de croissance ; (2) la phase d'arrêt et (3) la phase de ramification distale. Pendant la phase de croissance, SHH induit la prolifération du mésenchyme via PTC et GLI. SHH à faible concentration ou WNT7b pourraient aussi contrôler positivement l'expression de FGF10 dans le mésenchyme. FGF10 va agir sur l'épithélium et permettre la croissance directionnelle des bourgeons. Pendant la phase d'arrêt, SHH à forte concentration inhiberait l'expression de Fgf10, qui se trouverait alors relocalisé latéralement. Par ailleurs, BMP4 inhiberait la croissance de l'épithélium distal et les différents membres de la famille SPROUTY s'opposeraient à l'activité de FGF10. Un ou plusieurs membres de la famille SPROUTY pourraient aussi régler négativement l'effet de FGF10 sur les cellules épithéliales. Pendant la phase de ramification, FGF10, exprimé latéralement, induirait de nouveau la croissance directionnelle des bourgeons via le récepteur FGFR2b présent spécifiquement dans l'épithélium.

tion de ramifications. Elles sont illustrées dans la *figure 5*.

Au cours de la phase de croissance, SHH, sécrété par l'épithélium distal, stimule la prolifération du mésenchyme *via* PTC et GLI. Il n'y a pas encore de preuves expérimentales que SHH puisse régler positivement l'expression de *Fgf10*. Par exemple, d'autres facteurs tels que les WNT (*Wnt7b* est exprimé par l'épithélium distal) pourraient aussi contrôler l'expression de *Fgf10* de façon dépendante de la dose. En retour, FGF10, sécrété par le mésenchyme, va alors agir sur l'épithélium, *via* le FGFR2-IIIb, pour promouvoir la prolifération cellulaire, moduler l'adhérence cellulaire et permettre la migration des cellules. Ce processus va permettre de diriger la croissance des bourgeons vers la source localisée de FGF10 jusqu'à ce qu'une boucle de rétrocontrôle négatif arrête ce phénomène.

La phase d'arrêt de la prolifération pourrait impliquer *Bmp4* qui est fortement exprimé au niveau de l'épithélium distal. Au fur et à mesure que le bourgeon croît, un gradient de BMP4 se formerait avec une forte concentration dans la partie la plus distale du bourgeon. A partir d'une certaine dose seuil, BMP4 s'opposerait à l'activité de FGF10 en inhibant la prolifération de l'épithélium distal de telle façon que FGF10 agisse maintenant principalement sur les cellules épithéliales situées latéralement par rapport aux cellules les plus distales. D'autres facteurs qui contrôlent l'activité des FGF tels que les héparane sulfates ou les membres de la famille SPROUTY pourraient également être importants dans ce processus de croissance. Il est à noter que de fortes concentrations de SHH ou de WNT7b au niveau de l'épithélium distal pourraient aussi réduire le niveau d'expression de *Fgf10* au-dessus du bourgeon, limitant ainsi la croissance de l'épithélium.

Lors de la formation des ramifications distales, l'expression de *Fgf10* est relocalisée latéralement sous l'effet de modestes concentrations de SHH ou de WNT7b. Deux ramifications distales vont alors se former selon le mécanisme d'action décrit dans la phase de croissance des bourgeons. Ce modèle, essentiellement fondé sur les molécules de signalisation est bien évidemment incomplet car il ne fait

pas appel aux protéines de la membrane basale ni à leurs récepteurs, les intégrines. Ceux-ci peuvent moduler l'état d'adhérence et la prolifération des cellules. Dans le futur, il faudra donc intégrer les découvertes réalisées sur les voies de signalisation, les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire afin de permettre une meilleure compréhension de la morphogenèse pulmonaire et de la comparer à celle de la glande mammaire, du pancréas ou du rein ■

## RÉFÉRENCES

1. Bogue CW, Lou LJ, Vasavada H, Wilson CM, Jacobs HC. Expression of *Hoxb* genes in the developing mouse foregut and lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 163-71.
2. Mollard R, Dziadek M. Homeobox genes from clusters A and B demonstrate characteristics of temporal colinearity and differential restrictions in spatial expression domains in the branching mouse lung. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 655-66.
3. Aubin J, Lemieux M, Tremblay M, Berard J, Jeannotte L. Early postnatal lethality in *Hoxa-5* mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* 1997; 192: 432-45.
4. Meno C, Shimono A, Saijoh Y, et al. Lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of Lefty-2 and Nodal. *Cell* 1998; 94: 287-97.
5. Oh SP, Li E. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev* 1997; 11: 1812-26.
6. Ten-Have Oprobek AAW. Lung development in the mouse embryo. *Exp Lung Res* 1991; 17: 110-30.
7. Alescio T, Cassini A. Induction *in vitro* of tracheal buds by pulmonary mesenchyme grafted on tracheal epithelium. *J Exp Zool* 1962; 150: 83-94.
8. Wessells NK. Mammalian lung development: interactions in formation and morphogenesis. *J Exp Zool* 1970; 175: 455-66.
9. Taderera JV. Control of lung differentiation *in vitro*. *Dev Biol* 1967; 16: 489-512.
10. Sautier JM, Forest N. Les protéines de la morphogenèse osseuse: BMP. *Med Sci* 1996; 12: 364-70.
11. Deutsch J, Busson D. Des récepteurs pour les protéines de signalisation de la famille Wnt, enfin? *Med Sci* 1997; 13: 222-4.
12. Bellusci S, Henderson R, Winnier G, Oikawa T, Hogan BL. Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein-4 (*Bmp4*) plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* 1996; 122: 1693-702.
13. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BL. Involvement

of Sonic hedgehog (*Shh*) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 1997; 124: 53-63.

14. Bellusci S, Grindley J, Emoto H, Itoh N, Hogan BL. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development* 1997; 124: 4867-78.

15. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BLM. Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9: 2105-16.

16. Wert SE, Glasser SW, Korfhagen TR, Whitsett JA. Transcriptional elements from the human *SP-C* gene direct expression in the primordial respiratory epithelium of transgenic mice. *Dev Biol* 1993; 156: 426-43.

17. Thérond P, Lamour-Isnard C, Plessis A. Dissection moléculaire de la voie de transmission du signal Hedgehog. *Med Sci* 1998; 14: 603-6.

18. Grindley JC, Bellusci S, Perkins D, Hogan BL. Evidence for the involvement of the *Gli* gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol* 1997; 188: 337-48.

19. Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 1998; 20: 58-61.

20. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 1998; 20: 54-7.

21. Ingham PW. Signalling by hedgehog family proteins in Drosophila and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 492-8.

22. Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and *Fgf4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 1994; 79: 993-1003.

23. Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing *Bmp4* and *Hox* genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 1995; 121: 3163-74.

24. Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J* 1994; 13: 3296-301.

25. Min H, Danilenko DM, Scully SA, et al. *Fgf10* is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to Drosophila *branchless*. *Genes Dev* 1998; 12: 3156-61.

26. Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, et al. *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* 1999; 21: 78-81.

27. Laufer E, Nelson CE, Johnson RI, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and *Fgf4* act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 1994; 79: 993-1003.

## RÉFÉRENCES

28. Ohuchi H, Nakagawa T, Yamamoto A, *et al.* The mesenchymal factor, FGF10 initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 1997; 124: 2235-44.
29. Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching in the mammalian lung. *Curr Biol* 1999; 8: 1083-6.
30. Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA. *branchless* encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 1996; 87: 1091-101.
31. Glazer L, Shilo BZ. The Drosophila FGF-R homolog is expressed in the embryonic tracheal system and appears to be required for directed tracheal cell expansion. *Gene Dev* 1991; 5: 697-705.
32. Hacohen N, Kramer S, Sutherland D, Hiromi Y, Krasnow D. *sprouty* encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* 1998; 92: 253-63.
33. Casci T, Vinos J, Freeman M. Sprouty, and intracellular inhibitor of Ras signaling. *Cell* 1999; 96: 655-65.
34. De Maximy AA, Nakatake Y, Moncada S, Itoh N, Thiery JP, Bellusci S. Cloning and expression pattern of a mouse homologue of Drosophila *sprouty* in the mouse embryo. *Mech Dev* 1999; 81: 217-20.
35. Tefft JD, Lee M, Smith S, *et al.* Conserved function of *mSpry-2*, a murine homolog of Drosophila *sprouty*, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr Biol* 1999; 9: 219-22.

### Summary

#### Molecular basis of lung branching morphogenesis

Branching morphogenesis, the process whereby epithelial tubes give rise to tree-like structures, is fundamental to the formation of most organs. In vertebrates, the development of the lung, pancreas, mammary gland, kidney or prostate rely on the controlled formation of branches. Genetic and classical embryological experiments have shown that the stereotypic and repetitive bifurcation of an epithelial tube depends on reciprocal interactions between the epithelium and the surrounding cells, most often mesenchymal. To date, the molecular aspects of these interactions and how they work at the cellular level are largely unknown. We have used the mouse embryonic lung as a model system to unravel the genetic and molecular basis of branching morphogenesis.



INSTITUT COCHIN DE GÉNÉTIQUE  
MOLÉCULAIRE