

Positionnement des membres sur l'axe dorso-ventral : rôle d'Engrailed-1

Lors du développement embryonnaire, les cellules s'assemblent afin de former des organes et des membres en nombre défini, à une position bien établie dans l'embryon et en respectant une orientation précise. Ce processus, appelé *patterning*, se produit simultanément à une phase de division cellulaire prodigieuse. Il est donc nécessaire que la destinée des cellules en prolifération soit clairement définie et strictement contrôlée afin de ne pas conduire à des malformations. L'une des caractéristiques importantes de la morphogenèse des membres est qu'elle est induite à l'interface entre le dos et le ventre. Bien que de nombreuses mutations affectent le développement des membres, il n'existe pas de malformations entraînant l'apparition des membres au milieu du dos ou au milieu du ventre. En outre, l'induction de membres supplémentaires, par exemple après implantation de billes contenant du FGF2, dans le flanc d'embryons de poulet se produit toujours à la limite entre la face dorsale et la face ventrale, quel que soit l'emplacement initial dorso-ventral de la bille [1]. Cela suggère, par conséquent, l'existence de mécanismes de contrôle extrêmement puissants spécifiant la formation des bourgeons de membres à une position donnée le long de l'axe dorso-ventral du corps.

Émergence du bourgeon de membre

Chez les vertébrés, le bourgeon de membre émerge d'une région plane grâce à l'action conjuguée du mésoderme de la lame latérale et de l'ectoderme la recouvrant. A l'extrémité distale du bourgeon, l'ecto-

derme s'épaissit en une zone spécialisée appelée la crête apicale (ou *apical ectodermal ridge*, AER) [2]. Les cellules précurseurs de la crête apicale sont mélangées aux cellules qui formeront l'ectoderme et sont largement réparties dans l'ectoderme précoce [1]. Cependant, la crête apicale définitive se positionne exactement à la jonction entre le domaine dorsal et le domaine ventral du bourgeon naissant et s'étend parallèlement à l'axe antéro-postérieur (*figure 1A*). Ce centre organisateur dirige, par la suite, la croissance proximo-distale du bourgeon en maintenant la prolifération des cellules mésenchymateuses de la zone de croissance (*progress zone*) situées juste en dessous grâce, entre autres, à plusieurs membres de la famille des FGF [2].

Les faces dorsale et ventrale de l'embryon

Jusque récemment, l'origine embryonnaire des cellules qui forment les faces dorsales et ventrales de l'embryon n'était pas connue. Nous avons cartographié de façon systématique le devenir des cellules de l'ectoderme précoce de l'embryon de poulet en appliquant un colorant vital fluorescent (le DiI ou le DiA), environ 24h avant le bourgeonnement des membres, au niveau des régions précurseurs d'origine de l'aile, du flanc et de la patte. Ce colorant, transmis de génération en génération, permet d'analyser le devenir de la descendance d'un petit nombre de cellules. Après 48h, deux catégories de résultats ont été obtenues: les cellules marquées colonisaient, soit la face dorsale du bourgeon ou du flanc, lorsque le marquage avait été

effectué dans la première moitié de la région précurseur (au plus proche des somites); soit la face ventrale, lorsque le marquage avait été effectué dans la seconde moitié de la région précurseur (*figure 1B*). En aucun cas, les cellules ne franchissaient la crête apicale ou une limite formée par une ligne « imaginaire » allant de la base du bourgeon d'aile au sommet du bourgeon de patte pour envahir la face opposée (*figure 1B*). Nous en avons donc conclu qu'il existait un phénomène de restriction qui empêche les cellules dorsales de se mélanger avec les cellules ventrales [1]. L'organisation en compartiments de restriction cellulaire est bien connue chez la drosophile [3]. C'est en 1973 qu'Antonio Garcia-Bellido proposa ce concept révolutionnaire: un groupe de cellules fondatrices forme un domaine dans lequel toutes les cellules appartiennent au même lignage cellulaire qui ne peuvent se mélanger avec les cellules adjacentes appartenant à un autre lignage cellulaire [4]. A l'interface entre les deux compartiments, une zone frontière s'établit où le contact entre les deux lignées est minimal. La destinée des cellules de chaque compartiment est distincte. Chez les vertébrés, peu de compartiments ont jusqu'à présent été mis en évidence. Hormis les membres, les seuls compartiments connus sont localisés dans le cerveau précoce [5, 6].

Nos résultats montrent donc que les cellules de l'ectoderme dorsal et les cellules de l'ectoderme ventral sont intrinsèquement différentes. Leur destinée est fixée par leur lignage d'origine. Or c'est précisément à l'interface entre ces deux populations que se forment les bourgeons de membres. La

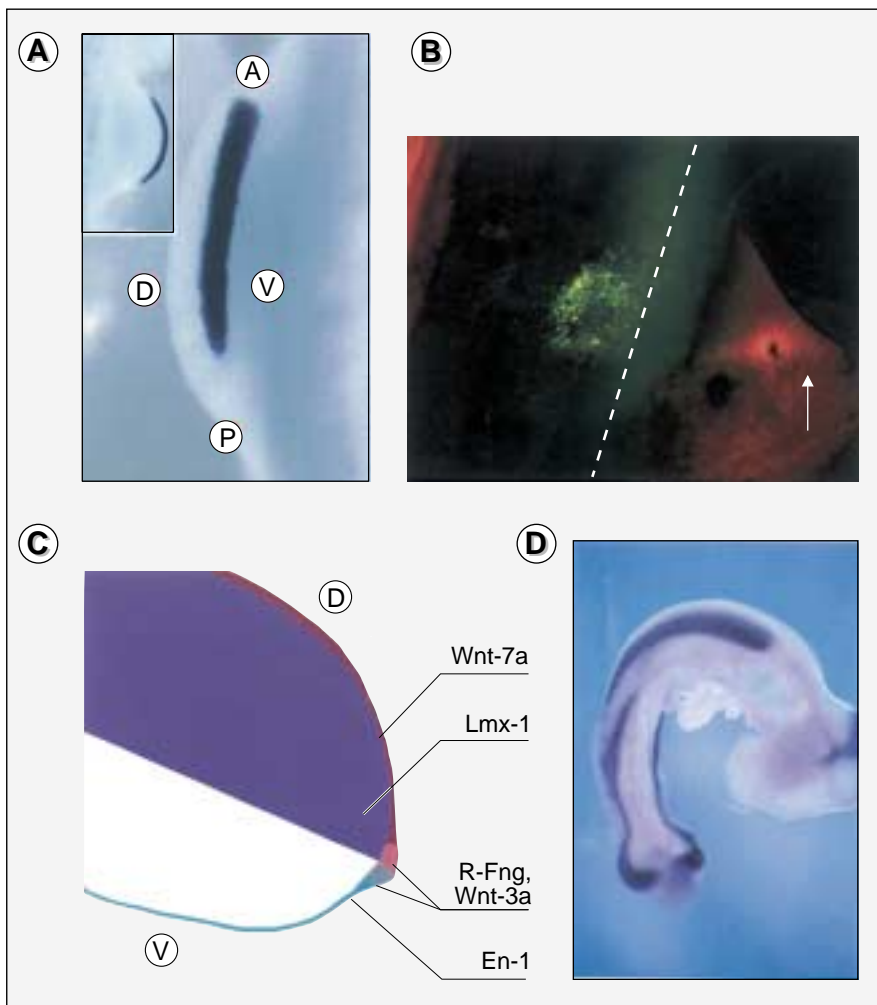


Figure 1. **L'émergence des bourgeons de membre.** **A.** Vue latérale d'un bourgeon de membre d'embryon de poulet de 3 jours. La crête apicale est visualisée par hybridation in situ avec une sonde *Fgf-8* (coloration bleue). En médaillon, vue dorsale du même bourgeon. A: antérieur; P: postérieur; D: dorsal; V: ventral. **B.** Restriction cellulaire au niveau du flanc. Le colorant vital fluorescent a été appliqué sur l'ectoderme précoce du flanc, dans la région médiale par rapport aux somites (ligne pointillée imaginaire entre l'aisselle et l'aîne, séparant le dos du ventre). Après 48 h, les cellules marquées restent confinées à la partie dorsale du flanc et ne franchissent pas la limite d'une ligne imaginaire entre l'aisselle et l'aîne séparant le dos du ventre. Noter la forme arrondie du bourgeon d'aile en haut à droite de la photo (ligne pointillée et flèche). **C.** Représentation schématique en coupe transversale du profil d'expression des gènes connus à l'heure actuelle dont l'expression sur l'axe dorso-ventral est restreinte. **D.** Profil d'expression du gène *En-1* sur un embryon de poulet d'environ trois jours. *En-1* est exprimé sur la face ventrale des bourgeons d'aile et de patte ainsi que sur la face ventrale du flanc (coloration bleue). L'expression de ce gène est aussi visible dans le cerveau et les somites.

compartimentation de l'ectoderme précoce avant la formation des bourgeons pourrait donc représenter un mécanisme fondamental grâce auquel les membres auraient une position précise sur l'axe dorso-ventral.

Les gènes « sélecteurs »

En parallèle de l'introduction du concept de compartiments cellulaires, Garcia-Bellido émit aussi l'hypothèse selon laquelle l'expres-

sion restreinte de gènes « sélecteurs » sous-tendait le comportement distinct des deux populations cellulaires pendant la morphogenèse [7]. Ces gènes apporteraient, d'une part, l'identité au compartiment dans lesquels ils sont exprimés et permettraient, d'autre part, d'empêcher le mélange entre cellules appartenant à des compartiments adjacents. Quels peuvent être les gènes mis en jeu dans l'établissement de la restriction cellulaire le long de l'axe dorso-ventral dans le membre? L'ectoderme dorsal des bourgeons de membres synthétise, notamment, le facteur de croissance *Wnt-7a*, dont le signal est partiellement relayé au niveau du mésoderme dorsal par le facteur de transcription *Lmx-1* (figure 1C) [8, 9]. *Wnt-3a*, qui agit par la voie β -caténine/LEF1, ainsi que *Radical-Fringe* (*R-Fng*) sont exprimés à l'interface dorso-ventrale avant et après formation de la crête apicale (figure 1C) [10-12]. L'expression de *R-Fng* a été récemment impliquée dans l'induction de l'AER (*m/s* 1997, n° 6-7, p. 914) [11, 12]. Cependant, aucun de ces gènes n'est exprimé dans le flanc. En revanche, le facteur de transcription *En-1* est exprimé sur la face ventrale de l'ectoderme des bourgeons de membres et du flanc (figure 1C, D) [13]. Nous avons montré la coïncidence directe entre le domaine d'expression d'*En-1* et le compartiment ventral de restriction cellulaire, grâce à une nouvelle technique permettant à la fois la cartographie cellulaire et la détection de l'expression génique [14]. Les cellules de la lignée dorsale respectent la frontière marquée par la limite d'expression d'*En-1*, tant au niveau du membre qu'au niveau du flanc. De même, les cellules de la lignée ventrale sont restreintes au domaine d'expression d'*En-1*. Le facteur *En-1* est donc un marqueur moléculaire du compartiment ventral, ce qui suggère qu'il joue un rôle dans le phénomène de restriction cellulaire des compartiments dorso-ventraux. En accord avec cette hypothèse, les souches dont le gène *En-1* est fonctionnellement inactivé possèdent une polarité dorso-ventrale défectueuse au niveau moléculaire (expansion ventrale de l'expression des gènes normalement

restreints au domaine dorsal), ce qui n'est pas le cas des souris dont le gène *Wnt-7a* est fonctionnellement inactivé [8, 15, 16]. En outre, chez la drosophile, *engrailed* (dont *En-1* est un des homologues chez les vertébrés) est considéré comme l'archétype du gène sélecteur [3, 17]. Il est exprimé dans tous les compartiments postérieurs : au niveau des segments d'abord, puis des disques imaginaux (aile, patte, haltères...). Son rôle a été très étudié dans les compartiments du disque imaginal d'aile. Les cellules mutantes pour *engrailed* perdent leurs caractéristiques de cellules postérieures et ne se mélangent plus avec les cellules postérieures exprimant *engrailed*, ce qui provoque la formation d'une zone frontière ectopique. Si le clone mutant est suffisamment proche de la zone limite, les cellules mutantes sont alors capables de chevaucher ou de franchir la zone limite entre les deux compartiments pour gagner le compartiment antérieur. Par ailleurs, l'expression ectopique d'*engrailed* dans le compartiment antérieur transforme les cellules antérieures en cellules postérieures. Ces transformations ont des conséquences visibles sur l'aspect de l'aile chez la mouche adulte.

Quel rôle pour *Engrailed-1* ?

Afin de déterminer le rôle d'*En-1* dans la mise en place des compartiments dorso-ventraux de l'ectoderme, nous avons entrepris une approche d'expression ectopique par voie rétrovirale. Cette approche avait déjà permis de montrer que l'expression ectopique d'*En-1* conduit à l'apparition d'anomalies dans la formation de la crête apicale : interruption de l'AER, déplacement de fragments d'AER sur la face dorsale, création d'AER ectopiques – le membre résultant étant incomplet [13]. Ces résultats suggéraient une modification possible de l'emplacement de l'interface dorso-ventrale par expression ectopique d'*En-1*. Cependant, les déplacements de fragments d'AER dorsalement étaient peu fréquents et de faible amplitude. En outre, ils ne conduisaient pas à la modification du positionnement des membres sur l'axe dorso-ventral

[13]. Bien que de nombreuses équipes se soient penchées sur le problème, les signaux et la période exacte d'induction des membres restent inconnus. Une infection trop tardive par rapport à la période d'induction des membres pouvait donc expliquer les résultats obtenus. Afin de circonvenir ce problème, nous avons artificiellement induit des membres supplémentaires (grâce au FGF-2) dans le flanc d'embryons de poulet préalablement infectés par un virus contenant *En-1*. De cette façon, le moment d'induction des membres est contrôlé. Dans les cas extrêmes, l'expression ectopique d'*En-1* conduit alors à l'abolition totale de la formation du membre supplémentaire. De plus, dans une faible proportion, les membres endogènes sont aussi extrêmement atrophiés [14]. Dans les deux cas, toute trace morphologique ou moléculaire de l'AER a disparu. Il est donc impossible de déplacer dorsalement le lieu de formation des membres en modifiant l'expression d'*En-1*. En revanche, ces résultats montrent le rôle-clé du facteur de transcription *En-1* lors de la formation de la crête apicale et ensuite dans la croissance du bourgeon de membre.

L'abolition de la formation des membres par l'expression ectopique d'*En-1* suggère que le compartiment dorsal a été transformé en compartiment ventral, à l'instar de la transformation de cellules antérieures en cellules postérieures chez la drosophile. De fait, cela expliquerait l'absence de formation de crête apicale dont l'induction nécessite la confrontation entre le compartiment dorsal et le compartiment ventral. La cartographie des lignages cellulaires de l'ectoderme sur les embryons infectés a montré, de façon tout à fait inattendue, que l'expression ectopique d'*En-1* n'entraîne pas la levée de la restriction dorso-ventrale observée dans les embryons normaux. Les cellules ne franchissent pas l'interface dorso-ventrale même dans les régions où la crête apicale a totalement disparu [14]. Ce fait est absolument remarquable et démontre que *En-1* n'est pas le gène sélecteur des compartiments dorso-ventraux dans les membres des vertébrés.

Perspectives

Les compartiments ont donc un rôle fondamental dans le positionnement des membres le long de l'axe dorso-ventral. L'une des fonctions du compartiment ventral est vraisemblablement de définir une population définie de cellules dans laquelle *En-1* puisse être activé, et d'établir une limite stricte entre les cellules exprimant *En-1* et celles qui ne l'expriment pas. Ce prérequis est indispensable à la formation correcte de la crête apicale. Puisque l'identité dorso-ventrale peut persister alors que l'expression de certains « marqueurs dorso-ventraux » est perturbée, cela implique que des gènes encore inconnus dont l'expression est restreinte sur l'axe dorso-ventral président à la restriction cellulaire. Ces résultats démontrent aussi le caractère secondaire de la formation de la crête apicale à la suite de la confrontation dorso-ventrale des compartiments. En aucun cas, la crête apicale ne constitue une barrière physique empêchant le mélange entre cellules du compartiment dorsal avec celles du compartiment ventral. Sur le plan de l'évolution, il est intéressant de noter que, même si certains gènes impliqués dans la compartimentation ont été conservés entre les invertébrés et les vertébrés, leur fonction a évolué. Il reste que toute la puissance que représente l'organisation cellulaire en compartiments a perduré ■

Remerciements

Je remercie chaleureusement Cheryl Tickle dont les qualités humaines et professionnelles sont indicibles. Merci à Andrew Lumsden et Cairine Logan pour leurs critiques constructives qui ont fait avancer ce travail. Ma période post-doctorale a été financée par l'Association pour la recherche contre le cancer et le programme TMR Marie-Curie de la Communauté européenne.

RÉFÉRENCES

1. Altabel M, Clarke J, Tickle C. Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 1997; 124; 4547-56.

RÉFÉRENCES

2. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997; 90; 979-90.
3. Royet J. Organisation spatiale des disques imaginaux et des bourgeons de membres. *Med Sci* 1998; 14; 1167-75.
4. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* 1973; 245; 251-3.
5. Fraser S, Keynes R, Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restriction. *Nature* 1990; 344: 431-5.
6. Figdor MC, Stern CD. Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* 1993; 363; 630-4.
7. Garcia-Bellido A. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* 1975; 29; 161-82.
8. Parr BA, McMahon AP. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 1995; 374; 350-3.
9. Riddle RD., Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessell TM, Tabin C. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 1995; 83; 631-40.
10. Kengaku M, Capdevila J, Rodriguez-Esteban C, De La Pena J, Johnson RL, Belmonte JCI, Tabin CJ. Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 1998; 280; 1274-7.
11. Laufer E, Dahn R, Orozco OE, Yeo CY, Pisenti J, Henrique D, Ursula KA, Fallon J.F, Tabin C. Expression of *Radical Fringe* in limb bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 1997; 386; 366-73.
12. Rodriguez-Esteban C, Schwabe JWR, De La Peña J, Foy B, Eshelman B, Izpisua Belmonte JC. *Radical Fringe* positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 1997; 386; 360-6.
13. Logan CC, Hornbruch A, Campbell I, Lumsden A. The role of *Engrailed* in establishing the dorso-ventral axis in chick limb. *Development* 1997; 124; 2317-24.
14. Altabef M, Logan C, Tickle C, Lumsden A. *Engrailed-1* misexpression prevents apical ridge formation and vertebrate limb development but preserves segregation of dorsal and ventral ectodermal compartments. 1999 (soumis).
15. Cygan JA, Johnson RL, McMahon AP. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development* 1997; 124; 5021-32.
16. Loomis CA, Kimmel RA, Tong CX, Michaud J, Joyner AL. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development* 1998; 125; 1137-48.
17. Hidalgo A. The roles of engrailed. *Trends Genet* 1996; 12; 1-4.

Muriel Altabef

Docteur en médecine, chercheur post-doctoral. Department of Developmental Neurobiology, King's College, Guy's Campus, SE1 9RT, London, Royaume Uni.

Adresse actuelle : Équipe adhésion et migration cellulaires, Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire du développement, Université Pierre-et-Marie-Curie, Bâtiment C-30, 9, quai Saint-Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France.

TIRÉS À PART

M. Altabef.