

Le contrôle de l'expression des gènes homéotiques par la structure de la chromatine est-il conservé au cours de l'évolution ?

Jean Deutsch

Les gènes Hox déterminent l'identité des segments de la larve de drosophile puis, au cours de la métamorphose pupale, spécifient encore le plan d'ensemble de l'adulte. Le maintien de leur expression, malgré l'extinction des gènes embryonnaires précoces, est dû à l'action de deux groupes de gènes, Polycomb maintenant les gènes Hox

dans un état réprimé, et trithorax dans un état actif. Les produits de ces deux groupes de gènes ont en commun de se lier à la chromatine, soit gelant la transcription, soit laissant libre l'accès aux promoteurs. Les vertébrés possèdent des gènes homologues de Polycomb et trithorax qui, agissant aussi sur la chromatine, contrôleraient

l'expression des gènes Hox selon un programme temporel, les segments antérieurs étant développés avant les segments postérieurs chez tous les chordés. Ce mode de régulation de la transcription par l'état de la chromatine, très primitif, aurait précédé la régulation au niveau du démarrage de la transcription.

Si la structure et l'expression des gènes homéotiques (gènes *Hox*) sont de mieux en mieux connus, chez la drosophile et chez les mammifères, leur régulation a été moins étudiée. Il ressort de cette étude qu'une part importante de cette régulation ne se situe pas seulement au niveau du déclenchement de la transcription de ces gènes, mais en amont, au niveau de la structure de la chromatine elle-même. L'objet du présent article est de présenter les données et les hypothèses couramment admises à ce propos. Placer ces mécanismes dans la perspective de l'évolution permet de proposer quelques hypothèses originales.

Les deux morphogenèses de la drosophile : embryogenèse et métamorphose

La drosophile est un insecte holométabole. A ce titre, au cours de sa vie,

elle accomplit deux morphogenèses : la première, précoce, fera d'un embryon un organisme complet (à la sexualité près), la larve ; la seconde, tardive, transformera la larve en un adulte (*imago*) au cours de la métamorphose pupale. Si la larve, l'asticot, paraît à première vue très différente de l'adulte, la mouche, ces deux organismes ont cependant en commun le même plan d'ensemble : l'un et l'autre sont des organismes métamérisés, composés de segments, et les segments de l'un et de l'autre se correspondent sans ambiguïté. On reconnaît trois segments thoraciques chez la larve, qui correspondent aux trois segments thoraciques de l'adulte, de même pour les segments abdominaux. La métamorphose de la mouche est « isomorphique » (pour revue, voir [1]).

L'isomorphie n'est pas le simple résultat du fait que ces deux organismes sont issus d'un même œuf. Chez un autre arthropode, la Sacculine du crabe, *Sacculina carcini*, si la

larve ressemble sans qu'on puisse en douter à une larve segmentée de Crustacé, l'adulte est réduit à un sac d'ovaires, ne présentant plus aucune trace de métamérie [2].

Le maintien de l'expression des gènes homéotiques chez la drosophile : Polycomb et trithorax

L'homologie des segments de la larve et de l'adulte de drosophile est due à l'expression des mêmes gènes homéotiques (gènes *Hox*), d'une part, dans les segments de l'embryon et, de l'autre, dans les disques et histoblastes imaginaires qui donneront, bien plus tard, naissance aux tissus adultes. Pourtant, au moment de la seconde morphogenèse, les gènes précoces embryonnaires, gènes cardinaux (*gap genes*) et gènes de parité segmentaire (*pair rule genes*), qui ont permis l'induction de l'expression des gènes homéotiques [1], ne sont

plus à l'œuvre depuis longtemps. Les gènes homéotiques ne sont pas ré-exprimés lors de la métamorphose. Ce qui se passe, c'est que leur profil d'expression est maintenu depuis l'embryogenèse jusqu'à la seconde morphogenèse.

Ce maintien de l'expression, au travers d'un temps de développement long de trois mues et d'un nombre important de divisions cellulaires dans les tissus imaginaux, est dû à l'action de deux groupes de gènes : (1) les gènes du groupe *Polycomb* (*Pc-G*) agissent pour maintenir les gènes homéotiques en l'état réprimé dans les tissus appropriés; (2) les gènes du groupe *trithorax* (*trx-G*), sont au contraire des régulateurs positifs qui maintiennent l'état actif des gènes *Hox*.

Chacun de ces groupes comprend, suivant les estimations, une dizaine à une trentaine de gènes, dont beaucoup sont déjà connus [3].

Les produits des gènes des groupes Polycomb et trithorax sont des protéines qui se lient à la chromatine

Le premier de ces gènes dont la structure moléculaire a été analysée est le gène *Polycomb* lui-même, qui donne son nom au groupe. La séquence de la protéine a révélé un domaine de forte similitude avec une protéine déjà connue chez la *Drosophile*, la protéine HP1 [4]. Cette protéine est un composant non histone de l'hétérochromatine centromérique. Le gène qui la détermine est le gène *Su(var)205*, isolé pour son action sur la bigarrure (ou *variegation*) par effet de position. Ce phénomène de variéation est provoqué par l'interaction entre l'hétérochromatine et un gène, situé normalement dans l'euchromatine, à la suite d'un remaniement chromosomique (pour revue voir [5] et l'article de M.O. Fauvarque, *m/s* n° 5, vol. 12, p. I-X).

Cette similitude a conduit à supposer que la protéine Polycomb (*Pc*) se liait elle aussi à la chromatine. La démonstration en a été apportée par l'analyse par anticorps de la localisation de la protéine *in situ* sur

les chromosomes géants des glandes salivaires de la larve. La protéine *Pc* se fixe à environ une centaine de sites reproductibles bien précis, comprenant les sites correspondant aux complexes de gènes *Hox*, localisés sur le bras droit du chromosome III. Au contraire de la protéine HP1, la protéine *Pc* ne se fixe qu'à l'euchromatine, et pas du tout à l'hétérochromatine centromérique [6]. On a démontré depuis que le domaine commun aux protéines *Pc* et HP1, baptisé « chromodomaine », est responsable de la fixation à la chromatine de la protéine *Pc* [7]. Les différences entre les chromodomaines de l'une et de l'autre protéine rendent compte de leur différence de spécificité vis-à-vis du type de chromatine [8].

Cela a conduit R. Paro à proposer un modèle dit d'hétérochromatinisation, [9, 10] dérivé du modèle d'action de masse proposé par Tartof pour la variéation [11]. Ce modèle prédit la formation d'un complexe multiprotéique, un « agrégulat » au sens de F. Jacob [12, 13], comprenant tout ou partie des produits des gènes *Pc-G*. L'agrégulat se formerait au niveau de sites précis (sites de nucléation), puis s'étendrait le long de l'ADN, par le simple effet de l'affinité de ces protéines les unes pour les autres. Dans cette conformation, la chromatine serait « gelée », empêchant la transcription des gènes (*figure 1*).

Les produits des gènes *trx-G* pourraient former un agrégulat semblable qui, soit bloquerait, quant à lui, la chromatine dans un état actif, laissant libre l'accès du promoteur au complexe de démarrage de la transcription, soit servirait de « barrière » à la propagation de l'agrégulat répressur *Pc-G*.

Ce modèle rend compte de nombre de propriétés génétiques des gènes *Pc-G* et *trx-G* : leur sensibilité au dosage génique, les interactions génétiques entre les membres de chaque groupe et entre les deux groupes de gènes. Il a reçu un certain nombre de confirmations expérimentales : (1) la collaboration entre l'équipe de R. Paro (Université d'Heidelberg, Allemagne) et celle de H. Brock (Université de Vancouver, Canada) a

permis de montrer que les cent sites de fixation sur les chromosomes de la protéine Polycomb et du produit d'un autre membre du groupe, le gène *polyhomeotic* (*ph*) coïncident parfaitement [14]; (2) par immunoprécipitation, il est possible de montrer que les deux produits sont engagés dans un même complexe protéique [14]; (3) V. Orlando et R. Paro ont étudié la fixation de la protéine Polycomb sur le complexe *Bithorax* (*BX-C*) dans une lignée cellulaire de *Drosophile* dans laquelle seul le gène *AbdominalB* (*AbdB*) est exprimé, les gènes *Ultrabithorax* (*Ubx*) et *abdominalA* (*abdA*) étant réprimés. La protéine Polycomb couvre littéralement la plupart des 300 kb étudiés, ne laissant libre que la région du gène *AbdB* [15]; (4) des sites de nucléation potentiels, répondant génétiquement aux gènes *Pc-G*, ont été localisés sur le complexe *BX-C*, qui comprend les trois gènes homéotiques *Ubx*, *abdA* et *AbdB*. Ils se situent au voisinage d'éléments de régulation des gènes *Ubx* et *abdA* précédemment identifiés, respectivement, *bxd* et *iab*) [16, 17].

Les arguments concernant les protéines du groupe *trx-G* sont moins cohérents. Cependant la protéine *Trithorax* elle-même possède un domaine, le « crochet à AT » (*AT hook*) que l'on retrouve dans les petites protéines non histones de la chromatine (protéines HMG) [18]. Ce domaine interagit avec l'ADN au niveau de séquences riches en AT. Le produit du gène *brahma*, un autre membre du groupe, présente un domaine très semblable à celui d'un gène de levure, *SWI2/SNF2* (*m/s* n° 1, vol. 9, p. 106). Ce domaine présente une fonction ATPase dépendant de l'ADN. L'hypothèse d'homologie entre les deux gènes est renforcée par la présence commune d'un second domaine, appelé « bromodomaine » [19]. Chez la levure, la protéine *SWI2* se lie à la chromatine en formant un agrégulat avec 8 ou 9 autres protéines [20]. Enfin, l'équipe de F. Karch (de l'Université de Genève) a montré qu'un autre membre du groupe, le gène *trithorax-like* (*trxl*) code pour une protéine, le facteur GAGA [21], connue à la fois pour sa capacité de déplacer les

nucléosomes [22], et comme régulateur du gène homéotique *Ubx* [23]. Le même gène possède aussi un rôle dans la variégation. Enfin la même équipe a mis en évidence des « barrières » séparant les éléments de régulation *iab* dans le complexe *BX-C*.

Les gènes homologues des vertébrés sont aussi des régulateurs des gènes *Hox*

Des gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G* possèdent des orthologues chez les vertébrés. En soi, la présence d'orthologues de ces gènes chez les vertébrés n'a rien de surprenant. La structure de la chromatine est commune à l'ensemble des eucaryotes, et il est probable qu'elle soit utilisée comme mécanisme de régulation génique chez tous. Après tout, il a été souligné que le bromodomaine est commun à des gènes de levure et de drosophile. Il n'est pas étonnant de le retrouver dans des gènes de mammifères. Chez la levure, on est assez loin d'attendre un rôle homéotique de ces gènes.

Il est cependant notable que l'homologue murin du gène *Pc* est capable de le remplacer dans ses fonctions chez la drosophile [24]. Toutefois, on peut toujours penser que cela résulte simplement de la conservation structurelle des deux protéines correspondantes. Plus décisive, en revanche, est la découverte récente que le gène murin *bmi-1*, orthologue du gène de drosophile *Posterior sex comb* (*Psc*), membre du groupe *Pc-G*, et le gène *Mill* (*ALL-1*), orthologue de *trx*, ont une fonction de régulateur des gènes homéotiques (*m/s n° 1*, vol. 9, p. 97) [25-27]. Non seulement la structure, mais la fonction de ces gènes sont donc conservées. L'effet des mutations de gènes murins est tout à fait parallèle à celui des gènes *Pc-G* et *trx-G* chez la drosophile. Ils produisent des transformations homéotiques qui, contrairement à celles produites par mutation des gènes *Hox*, ne sont pas localisées à une région, mais s'étendent sur tout l'axe antéro-postérieur. Le sens de ces transformations est en accord avec les fonctions attendues par analogie avec ce qui est connu chez

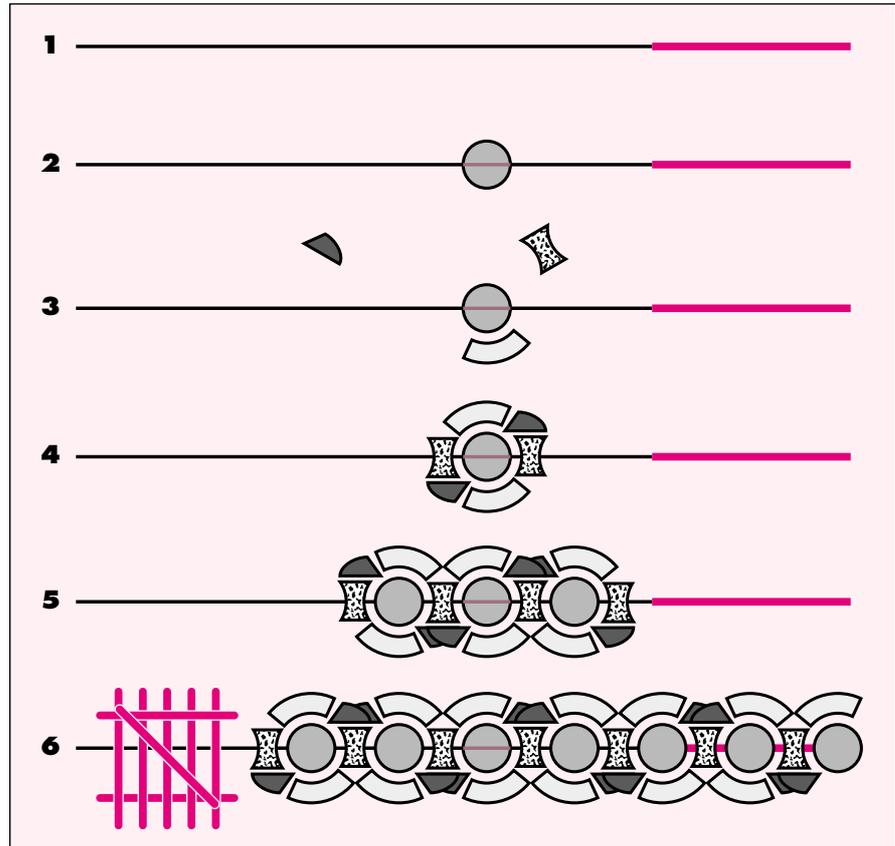


Figure 1. **Le modèle d'hétérochromatinisation** (interprété d'après [9]). 1: ADN nu; ligne fine: séquences de régulation; ligne rouge: séquence transcrite; ligne bistre: site de reconnaissance PRE (polycomb response element) des protéines du groupe Polycomb (*Pc-G*). 2: nucléation: l'une des protéines *Pc-G* (cercle gris) se fixe sur le site PRE. 3: recrutement: par leur affinité réciproque, les protéines *Pc-G* (\cup \bullet Δ ∇) se rassemblent au site PRE. 4: agrégation: formation d'un agrégat de protéines *Pc-G* au site PRE. 5: expansion: de nouveaux agrégats *Pc-G* se forment le long de la molécule d'ADN par suite de l'affinité des protéines *Pc-G* entre elles. On aboutit au blocage de la chromatine dans cette région comme par une fermeture éclair. 6: arrêt de l'expansion: la fermeture de la chromatine s'arrête lorsque l'agrégat de protéines *Pc-G* rencontre une barrière. La barrière pourrait être formée de l'agrégat d'une autre classe de protéines.

l'insecte, de régulateur négatif pour *bmi-1* et de régulateur positif pour *Mill/ALL-1*.

Quel est le rôle primitif des gènes des groupes Polycomb et trithorax? Discussion à la lumière de l'évolution

La régulation des gènes *Hox* par la structure de la chromatine a été mise en évidence chez la drosophile à propos d'un phénomène développemental tardif, la métamorphose. A

quoi peut servir ce type de contrôle chez les mammifères ?

On peut penser que, comme chez la drosophile, les gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G* sont impliqués chez les mammifères dans le maintien de l'expression des gènes *Hox*. Ce maintien est nécessaire dans certains cas, par exemple lors de la migration des cellules des arcs branchiaux : ces cellules doivent garder l'identité des tissus dont elles sont issues. L'identité de ces derniers est bien conférée par l'expression des gènes homéotiques au niveau des rhombomères [28].

Toutefois, le maintien de l'expression des gènes *Hox* chez les vertébrés n'a pas l'ampleur du phénomène observé chez les insectes holométa-boles. Pas de métamorphose chez les mammifères. Chez ces derniers l'identité homéotique n'a pas besoin d'être maintenue au-delà de quelques cycles de division cellulaire. Les mécanismes connus au niveau transcriptionnel, par auto-régulation et régulation croisée des gènes *Hox* entre eux, peuvent rendre compte à eux seuls de ce maintien, à courte distance.

De plus, si ce mécanisme chromatinien est conservé à la fois chez la drosophile et chez les vertébrés, l'hypothèse la plus simple est de penser qu'il est présent chez l'ancêtre commun à ces deux lignées. Or il est clair que les insectes holométa-boles, comme la drosophile, sont très éloignés de l'état ancestral (très « dérivés »). Les arthropodes les plus « primitifs », s'ils présentent des mues, ne présentent pas de métamorphose. *A fortiori*, il devait en être de même pour l'ancêtre commun. On est amené à rejeter l'idée que le maintien de l'expression des gènes homéotiques puisse être le rôle primitif des gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G*. Quel pourrait alors être ce rôle ? On est conduit à le rechercher dans un mode de développement originellement commun aux deux lignées, celle des arthropodes et celle des chordés.

La drosophile, qui présente une formation simultanée des métamères le long de l'axe, a un mode de développement très dérivé. Le mode de développement le plus fréquent (et le plus primitif) chez les insectes, et chez les arthropodes en général, est celui d'une mise en place progressive des métamères dans le sens antéro-postérieur. La mise en place progressive des segments (somites) est aussi la règle chez les chordés.

Contrôle par la chromatine et colinéarité temporelle

D. Duboule (de l'Université de Genève) a suggéré que c'est le contrôle temporel et non le contrôle spatial de l'expression des gènes *Hox* qui

serait le responsable de leur structure génomique en complexes de gènes liés et du maintien de cette structure au cours de l'évolution [29-32]. Il a proposé un modèle dans lequel un mécanisme de nature inconnue « lirait » le rythme de la division cellulaire et ouvrirait ainsi progressivement l'accès des gènes des complexes à la transcription. De cette façon, l'expression des gènes *Hox* est un processus « à sens unique », qui progresse toujours dans le même sens (3' → 5'), qu'on peut ralentir, mais qui ne peut jamais retourner en arrière.

Je suggère ici que le mécanisme postulé par D. Duboule est le contrôle de l'expression des gènes *Hox* par les modifications de la chromatine du complexe provoquées par les produits des gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G*.

Colinéarité et contrôle par les gènes *Pc-G* chez les insectes

Le concept de colinéarité a été introduit par E. Lewis (prix Nobel 1995) à partir de ses études génétiques du complexe *BX-C* de la drosophile [33]. Il est frappant de constater que la colinéarité dans le complexe *BX-C* de la drosophile est passablement différente de celle dont nous venons de parler. Dans le complexe *BX-C*, il y a bien trois gènes *Hox*, à savoir *Ubx*, *abdA* et *AbdB* [34]. Le profil d'expression spatial de ces trois gènes est bien colinéaire avec leur position dans le complexe : comme chez les vertébrés, le gène situé le plus en 3' (*Ubx*) s'exprime dans le domaine le plus antérieur, *abdA* dans un domaine plus postérieur, enfin *AbdB* plus postérieurement encore. La différence avec les vertébrés ne vient pas, ou pas seulement, du fait qu'il s'agisse ici uniquement de colinéarité spatiale (ces trois gènes s'expriment quasi simultanément). Le plus frappant, c'est que la colinéarité d'Ed Lewis fait référence non seulement aux gènes eux-mêmes, mais à leurs séquences de régulation. Ainsi, dans la direction 3' → 5' du complexe, on rencontre successivement la région *abx/bx* qui contrôle l'expression d'*Ubx* dans le parasegment (PS) 5, *bx_d/pbx* qui contrôle son expression dans le PS 6,

iab2 qui contrôle l'expression d'*abdA* dans le PS 7, *iab3* et *iab4* qui contrôlent l'expression d'*abdA* dans les PS 8 et 9 respectivement, et ensuite *iab5* jusqu'à *iab8* contrôlant l'expression d'*AbdB* dans les segments les plus postérieurs [33, 35].

Il n'est pas étonnant que des gènes de drosophile, ou plus généralement des gènes eucaryotes, bénéficient de régions *cis*-régulatrices de grande étendue, disséquables en éléments discontinus, chacun responsable d'une spécificité d'expression particulière. La colinéarité de la position de ces éléments sur la carte génétique et moléculaire et celle de leur domaine spécifique d'expression le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal est, en revanche, peu commune. Cette observation avait conduit Peifer, Karch et Bender à postuler (déjà en 1987) que ces éléments de régulation possèdent, en plus de propriétés *enhancer* classiques, des propriétés affectant la structure de la chromatine [35]. Le modèle proposé, dit de « l'accès à la transcription » (*open for transcription*), postule que la transcription d'*abdA* dans le PS 8 (par exemple) ne peut se produire que si l'élément *iab3* a été ouvert, et que cette ouverture ne peut s'effectuer sans ouverture préalable de *iab2*.

On voit la parenté de ce modèle avec le modèle de « route à sens unique » de D. Duboule [30]. Le modèle de Peifer *et al.* a reçu récemment une confirmation expérimentale : on a, en effet, montré que plusieurs de ces séquences régulatrices contiennent des éléments sensibles à l'action des gènes du groupe *Pc*, que l'on peut interpréter comme des sites de nucléation du complexe d'hétérochromatinisation [16, 17].

Cependant ce modèle est difficilement interprétable dans le cadre du développement de la drosophile. En effet, chez la drosophile, les segments (ou parasegments) sont formés simultanément, et l'expression d'*abdA* dans ces métamères est mise en place d'un seul coup dans l'ensemble de son domaine. On voit mal dès lors la nécessité de la colinéarité.

En revanche, la colinéarité prend tout son sens lorsqu'on regarde ce qui se passe chez un insecte comme le criquet *Schistocerca gregaria*. Le cri-

quet est un insecte considéré comme plus primitif que la drosophile : il ne fait aucun doute que l'apparition des orthoptères est plus ancienne que celle des diptères. Chez le criquet, contrairement à la drosophile, la formation des segments se produit progressivement, les segments les plus antérieurs se formant plus précocement que les plus postérieurs. L'expression d'*abdA* s'établit elle aussi progressivement, au fur et à mesure de la formation des segments abdominaux [36, 37]. La colinéarité spatiale est liée à une séquence temporelle d'expression. La nécessité de l'ouverture de l'expression d'*abdA* dans le PS 7 avant son expression dans le PS 8 apparaît.

Je tiens la colinéarité des éléments régulateurs du complexe *BX-C* chez *Drosophila melanogaster* pour un « fossile moléculaire vivant », le vestige d'un mécanisme ancestral de formation progressive des segments.

Le maintien et l'éclatement des complexes Hox

Si le raisonnement tenu ci-dessus est valable, on doit pouvoir observer une corrélation entre le maintien de la structure en complexe des gènes *Hox* et le type, simultané ou progressif, d'établissement du plan du corps. Dans bien des organismes, la connaissance des gènes *Hox* est plus avancée que celle de leur structure génomique. Cependant, cette corrélation est bien observée. Tous les chordés étudiés, depuis l'amphioxus [38] jusqu'aux mammifères (pour revue voir [39, 40]) en passant par les poissons téléostéens [41], possèdent des complexes de gènes *Hox*. Ces complexes ne contiennent que des gènes *Hox*, situés très près les uns des autres (à quelques kb ou dizaines de kb). Le sens de transcription de tous les gènes *Hox* du complexe est le même, ce qui fait que l'on peut parler d'un sens 5' → 3' pour l'ensemble du complexe. De l'autre côté, nous avons vu le cas de la drosophile *D. melanogaster*, chez laquelle le complexe n'est pas d'un seul tenant, mais coupé en deux parties, *ANT-C* et *BX-C*. Le gène *Hox Deformed (Dfd)* est orienté dans le sens opposé à

celui d'autres gènes homéotiques du complexe *ANT-C*. De plus, chacun des sous-ensembles est « parasité » par des gènes non homéotiques [42, 43]. Chez une autre drosophile, *D. pseudoobscura*, la structure du complexe *ANT-C* est très voisine de celle de *D. melanogaster*. Il contient lui aussi des gènes parasites. Toutefois le gène *Dfd* est orienté dans le bon sens [44]. Enfin, chez une troisième drosophile, plus éloignée, *D. virilis*, le complexe *BX-C* est lui-même coupé en deux (F. Karch, communication personnelle). Chez un lépidoptère, *Bombyx mori*, le ver à soie, dont le développement ressemble à celui des drosophiles en ce que la formation de segments se fait sans zone de croissance, les gènes *Hox* sont, là aussi, répartis en deux complexes [45]. En revanche, chez un insecte holométabole, donc assez voisin des mouches et des papillons, mais à développement progressif, le coléoptère *Tribolium castaneum*, le complexe est d'un seul tenant [46].

Sur une tout autre branche de l'arbre de l'évolution se situe le nématode *Caenorhabditis elegans*. Son développement est simultané le long de l'axe antéro-postérieur. Les quatre gènes *Hox* de *C. elegans* sont bien portés sur le même chromosome. Toutefois, ils sont séparés par des distances considérables (jusqu'à plus de 100 kb) et par de nombreux gènes non apparentés structurellement et fonctionnellement. Leur sens de transcription est variable, la colinéarité n'est pas respectée [47, 48].

Identité homéotique et division cellulaire

Les domaines d'expression des gènes *Hox* sont partiellement chevauchants ; ce qui est caractéristique, c'est la limite antérieure de chaque domaine. L'identité d'une région particulière sera la résultante d'une combinaison de protéines homéotiques. C'est ce qu'on a appelé le code *Hox*. Un tel système combinatoire avait été proposé dès 1978 par Ed Lewis à partir de ses travaux sur le complexe *BX-C* de la drosophile [33, 39, 49]. Chez les animaux à développement progressif, l'expression d'un gène

situé plus en 5' dans le complexe est plus tardive que l'expression du gène voisin en 3'. Dans le modèle de Duboule, la roue qui va « ouvrir » le gène en 5' est entraînée par le rythme de la croissance de la zone postérieure de formation des segments [30] (figure 2).

Un corollaire de ce modèle est le suivant : si l'on peut expérimentalement ralentir ce rythme, on va empêcher l'expression du gène situé en 5'. Cela revient à produire une phénotypie d'une mutation de perte de fonction d'un gène *Hox* : une transformation homéotique va en résulter et changer l'identité du segment en formation pour une identité plus antérieure.

Cette expérience-modèle a été réalisée effectivement, sur un arthropode à développement progressif, la limule, bien longtemps avant la mise en évidence de la présence de gènes *Hox* chez cet organisme [51]. Itow, en 1986, [52] a tiré parti de la lenteur du développement de cette espèce. En effet, la formation d'un segment abdominal prend environ deux jours. Cela laisse largement le temps de traiter la larve en croissance par un inhibiteur, puis de chasser l'inhibiteur après le traitement et de laisser le développement se poursuivre. Itow a observé que le traitement par des substances qui inhibent la multiplication cellulaire provoquait la formation de segments surnuméraires. En accord avec le modèle de Duboule, le nouveau segment formé présente une identité différente de celle attendue selon son numéro d'ordre : soit identique à celle du segment juste antérieur, soit intermédiaire.

De plus, Itow a observé que l'effet n'est pas dû au ralentissement de la croissance par lui-même : le traitement par des antimétabolites n'a aucun effet, seules les substances qui inhibent la réplication de l'ADN sont efficaces [52].

Structure de la chromatine et division cellulaire

L'expérience d'Itow est à mes yeux très significative. La phase de synthèse (S) est à coup sûr celle qui, au

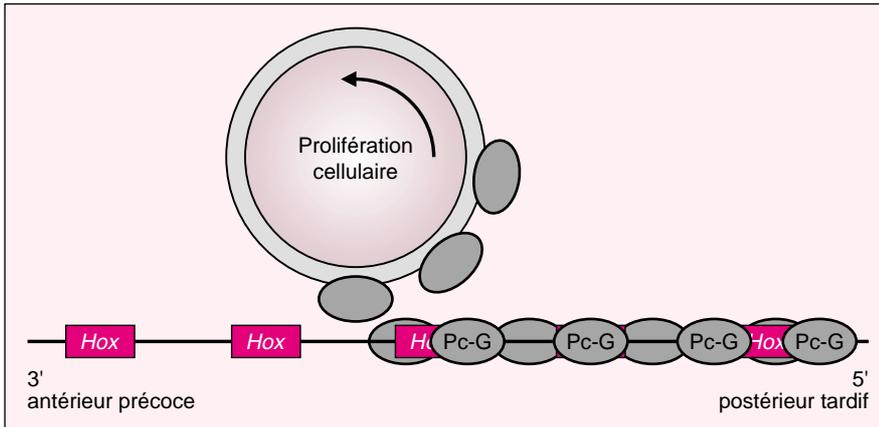


Figure 2. **Ouverture progressive de la chromatine des complexes Hox.** Au fur et à mesure de la prolifération cellulaire, le blocage de la chromatine par les protéines Pc-G est levé. L'expression des gènes Hox se met en place progressivement, à la fois au cours du temps et suivant l'axe antéro-postérieur. Les rectangles contenant les gènes Hox représentent les parties transcrites du complexe, la ligne fine les parties non transcrites du complexe. Les ovales gris représentent les agrégats des protéines Pc-G (interprété d'après [30, 31]).

repiquage en repiquage, on peut maintenir ces disques en culture des semaines et des mois entiers. Le disque peut alors être replacé dans une larve, où il subira les phénomènes hormonaux qui induisent la métamorphose, et il provoquera la formation d'un organe supplémentaire. En général, l'identité de cet organe respecte celle du disque d'origine : un disque de patte donne une patte, un disque d'aile donne une aile, ce qui montre que le développement des disques est déterminé. Nous savons aujourd'hui que ce maintien de l'identité des disques est dû au maintien de l'expression des gènes homéotiques grâce aux protéines des groupes Pc-G et trx-G. Il arrive toutefois qu'il se produise un changement d'identité : un disque d'aile peut donner... un œil ! C'est le phénomène appelé *transdétermi-*

cours du cycle cellulaire, permet le remaniement de la structure de la chromatine.

On est alors face à un paradoxe : la structure de la chromatine doit être à la fois assez stable lors des divisions cellulaires, puisque le contrôle ainsi réalisé se maintient, et assez souple pour pouvoir être remaniée. Qu'il en est bien ainsi est suggéré par les expériences de transdétermination chez la drosophile (pour revue, voir [53]).

Chez la drosophile, les tissus épidermiques adultes se développent au cours de la métamorphose à partir d'îlots de cellules formés à la fin de l'embryogenèse, les disques imaginaux. C'est le maintien de l'expression des gènes homéotiques en particulier dans ces disques qui permet à la métamorphose de conserver le plan général du corps. Chaque disque imaginal possède une forme caractéristique, qui permet au chercheur de reconnaître un disque d'aile, de balancier, d'œil ou de patte. Il est possible de prélever l'un de ces disques, et de le cultiver, *in vivo*, en le transplantant dans l'abdomen d'une mouche adulte. Ces transplantations peuvent être répétées, et de

Ordre	Espèce	Nom vulgaire	Nombre de divisions	Durée/cycle (heures)
Éphéméroptère	<i>Baetis rhodani</i>	éphémère	6	5
Odonate	<i>non spécifié</i>		7	3
Plécoptère	<i>Pteronarcys proteus</i>	perle	6	32
Odonate	<i>non spécifié</i>		7	3
Orthoptère	<i>non spécifié</i>			1,5
Isoptère	<i>Kaloterms flavicolis</i>	termite	6	8
Coléoptères	<i>Dermestes frischii</i>		11	0,5
	<i>Bruchidius obtectus</i>	bruche	13	1
Hyménoptères	<i>Habrobracon juglandis</i>		13	0,25
	<i>Apis mellifera</i>	abeille	12	0,5
Mécoptère	<i>Panorpa pryrei</i>	panorpe		1
Lépidoptères	<i>Anagasta Kühniella</i>		11	1
	<i>Chilo suppressalis</i>		11	0,5
Diptères	<i>Culex fatigans</i>	moustique	12	0,25
	<i>Dacus tyroni</i>		13	0,25
	<i>Cochliomyia hominivorax</i>		12	0,08
	<i>Drosophila melanogaster</i>		13	0,17

Le nombre de cycles de division incomplets (sans cellularisation) et la durée de ces cycles est notée pour chaque espèce (données d'après [62, 63]). Bien que la phylogénie des insectes soit encore l'objet de controverses, les espèces sont classées de haut en bas suivant l'ordre d'apparition possible des différents ordres d'insectes au cours de l'évolution. Les éphéméroptères et les plécoptères sont connus pour présenter un grand nombre de traits primitifs. Il ressort de ce tableau une tendance au raccourcissement de la durée de cycles au cours de l'évolution. Cela est particulièrement frappant lorsque l'on compare les hémimétaboles (haut du tableau) aux holométaboles (bas du tableau).

nation. On peut penser que le changement d'identité qui conduit à la transdétermination est dû à un remaniement des protéines des groupes Pc-G et trx-G. Il est connu que la transdétermination se produit lorsque le rythme des divisions cellulaires est accéléré [53].

Protéines Pc-G et trx-G, oncogène et cycle cellulaire

Les hypothèses proposées ci-dessus posent un nouveau problème : quel est le mécanisme qui permet à la chromatine de compter le nombre et/ou le rythme des réplifications ?

On ne peut que se livrer à des conjectures. L'un des modes possibles serait l'implication de l'un ou l'autre de ces mêmes produits des gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G*, à la fois dans le contrôle des gènes homéotiques et dans celui d'un élément clé du cycle cellulaire.

Cette idée est suggérée par le fait que les homologues de ces gènes chez les mammifères, dont il a été question plus haut, ont d'abord été connus pour leur caractère de proto-oncogène [54-56] ou suppresseur de tumeur [57]. C'est bien ce qu'on attend d'un partenaire du cycle cellulaire. Cela dit, l'effet peut être très indirect.

Dans le même ordre d'idées, et de manière peut-être plus significative, de nouveaux sites mutés isolés chez la drosophile sur la base d'un phénotype *Polycomb-like* (*multisexcomb*, *mx*) se sont révélés être allèles d'un gène suppresseur de tumeur [58].

Unité et diversité

Une fois encore, l'analyse génétique chez la drosophile et l'utilisation de la transgénèse chez la souris révèle une homologie profonde, inattendue à ce point, entre les mécanismes à l'œuvre dans le développement de ces deux espèces. Les gènes-maîtres mis en jeu sont homologues, ici les gènes *Hox*, révélant ainsi la profonde similitude du plan de base de tous les métazoaires, comme l'avait pressenti Geoffroy St-Hilaire [59]. Et de plus, les gènes régulateurs, ici les gènes des groupes *Pc-G* et *trx-G*, sont eux aussi

homologues, non seulement structurellement, mais fonctionnellement. Les données présentées et discutées ici conduisent à formuler l'idée que le contrôle par la structure de la chromatine, basé sur les protéines *Pc-G* et *trx-G* et sur la structure du complexe est un mécanisme essentiel de l'activité des gènes homéotiques. Ce mécanisme n'exclut pas l'intervention des mécanismes de régulation au niveau du démarrage de la transcription.

Il est tentant de penser que chez les vertébrés, ce deuxième mode de régulation intervient effectivement en second dans le temps : l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs et *enhancers* des gènes *Hox* se faisant, comme nous l'avons vu, progressivement, au fur et à mesure de la libération de ces sites par les produits des gènes *Pc-G*. A l'opposé, chez la drosophile, le contrôle par la chromatine intervient secondairement, après le déclenchement de l'expression des gènes homéotiques par la cascade des régulateurs précoces. On peut mettre cela en relation avec la rapidité des premiers cycles de division de l'œuf de drosophile. En effet, pendant les 10 premières divisions, ces cycles se succèdent au rythme quasi effrayant d'une division nucléaire toutes les huit à dix minutes. Ainsi un génome 33 fois plus important que celui d'*Escherichia coli* se réplique-t-il deux fois plus vite. Ces premiers cycles sont bien particuliers chez un eucaryote, et se réduisent à une succession de phases de synthèse et de mitose, sans phases G intermédiaires [60]. Cela conduit à la formation d'un embryon syncytial, la formation des membranes cellulaires n'intervenant qu'au cours de l'interphase du cycle 13. On peut penser que, dans ces conditions, les protéines de la chromatine ne puissent se fixer à l'ADN. Cela est bien en accord avec ce que l'on sait de l'expression et de l'action des gènes *Pc-G* : un certain nombre d'entre eux sont exprimés dès le stade syncytial (et parfois même maternellement), cependant leur action n'est effective que plus tardivement dans l'embryogenèse [61]. Il est notable que la rapidité de ces cycles s'est accrue au cours de l'évolution des insectes [62,

63] (*Tableau I*). Ainsi, le contrôle premier par la structure de la chromatine devenait-il inopérant. Il est remarquable que le bricolage de l'évolution [64] pourrait avoir recruté un mécanisme qui avait fait ses preuves, en faveur d'une innovation évolutive, la métamorphose vraie, qui marque le passage des insectes hémimétaboles aux insectes holométaboles.

Dans cette optique, le contrôle par la chromatine joue dans l'expression des gènes homéotiques un rôle à la fois primordial, primitif dans l'histoire évolutive et premier dans le temps du développement, du moins chez des organismes moins dérivés que la drosophile. On peut espérer que des études par transgénèse chez la souris et chez des arthropodes plus primitifs que la drosophile, pourront permettre prochainement de valider ou de rejeter cette conception ■

Remerciements

Autant qu'à mes lectures, cet article doit beaucoup à mes discussions avec de nombreux amis. Certains d'entre eux, Jean-Maurice Dura, Jean Guerdoux, Jean-Antoine Lepasant, Jean-Luc Rossignol, Pedro Santamaria, François Schweisguth, Yves Turquier, se sont donnés la peine de lire et de commenter une première version de ce texte. Qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés.

J. Deutsch

Maître de conférences, Laboratoire Évolution Moléculaire, Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris 6, 9, quai Saint-Bernard, case 241, 75252 Paris Cedex 05, France.

Note ajoutée aux épreuves

La structure du complexe Hox de *D. virilis*, citée comme F. Karch, communication personnelle, est aujourd'hui publiée [65].

RÉFÉRENCES

1. Lawrence PA. *The making of a fly. The genetics of animal design*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1992.
2. Hoeg JT. The biology and life cycle of the Rhizocephala (Cirrropedia). *J Mar Biol Ass UK* 1995; 75: 517-50.
3. Orlando V, Paro R. Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Op Genet Dev* 1995; 5: 174-9.
4. Paro R, Hogness DS. The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 263-7.
5. Eissenberg JC. Position effect variegation in *Drosophila*: towards a genetics of chromatin assembly. *BioEssays* 1989; 11: 14-7.
6. Zink B, Paro R. *In vivo* binding pattern of a trans-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1989; 337: 468-71.
7. Messmer S, Franke A, Paro R. Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 1992; 6: 1241-54.
8. Platero JS, Hartnett T, Eissenberg JC. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J* 1995; 14: 3977-86.
9. Paro R. Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet* 1990; 6: 416-21.
10. Moehrl A, Paro R. Spreading the silence: epigenetic transcriptional regulation during *Drosophila* development – a review. *Dev Genet* 1994; 15: 478-84.
11. Locke J, Kotarski MA, Tartof KD. Dose-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 1988; 120: 181-98.
12. Jacob F. Du répresseur à l'agrégulat. *CR Acad Sci Paris Ser III* 1993; 316: 331-3.
13. Santamaria P. Evolution and aggregates: role of the Polycomb-group genes of *Drosophila*. *CR Acad Sci Paris Ser III* 1993; 316: 1200-6.
14. Franke A, De Camillis M, Zink D, Cheng NS, Brock HW, Paro R. Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 1992; 11: 2941-50.
15. Orlando V, Paro R. Mapping Polycomb-repressed domains in the Bithorax complex using *in vivo* formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 1993; 75: 1187-98.
16. Chan CS, Rastelli L, Pirrotta V. A Polycomb response element in the *Ubx* gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J* 1994; 13: 2553-64.
17. Chiang A, O'Connor M, Paro R, Simon J, Bender W. Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development* 1995; 121: 1681-9.
18. Breen TR, Hatre PJ. Molecular characterization of the *trithorax* gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev* 1991; 35: 113-27.
19. Tamkun JW. The role of brahma and related proteins in transcription and development. *Curr Op Genet Dev* 1995; 5: 473-7.
20. Wolffe AP. Switched-on chromatin. *Curr Biol* 1994; 4: 325-8.
21. Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F. The *trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 1994; 371: 806-8.
22. Tsukiyama T, Becker PB, Wu C. ATP-Dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 1994; 367: 525-32.
23. Laney JD, Biggin MD. *zeste*, a nonessential gene, potentially activates *Ultrabithorax* transcription in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1992; 6: 1531-41.
24. Müller J, Gaunt S, Lawrence PA. Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* 1995; 121: 2847-52.
25. Alkema MJ, van der Lugt NMT, Bobeldijk RC, Berns A, van Lohuizen M. Transformation of axial skeleton due to overexpression of *bmi-1* in transgenic mice. *Nature* 1995; 374: 724-7.
26. Van der Lugt NMT, Domen J, Linders K, et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev* 1994; 8: 757-69.
27. Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GAJ, Korsmeyer SJ. Altered *Hox* expression and segmental identity in *Mil* mutant mice. *Nature* 1995; 378: 505-8.
28. Wilkinson DG, Krumlauf R. Molecular approaches to the segmentation of the hindbrain. *Trends Neurosci* 1990; 13: 335-9.
29. Duboule D. The vertebrate limb – a model system to study the Hox/HOM gene network during development and evolution. *Bio Essays* 1992; 14: 375-84.
30. Duboule D. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Development* 1994; suppl: 135-42.
31. Duboule D. Vertebrate *hox* genes and proliferation: an alternative pathway to homeosis? *Curr Op Genet Dev* 1995; 5: 525-8.
32. Renucci A, Urier G, Gerard M, Duboule D. Contrôle des gènes Hox au cours du développement des vertébrés: apports de la transgénèse. *médecine/sciences* 1993; 9: 157-64.
33. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978; 276: 565-70.
34. Bender W, Akam M, Karch F, et al. Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1983; 221: 23-9.
35. Peifer M, Karch F, Bender W. The bithorax complex: control of segmental identity. *Genes Dev* 1987; 1: 891-8.
36. Tear GAM, Martinez-Arias M. Isolation of an *abdominal-A* gene from the locust *Schistocerca gregaria* and its expression during early embryogenesis. *Development* 1990; 110: 915-26.
37. Kelsh R, Weinzierl ROJ, White RAH, Akam M. Homeotic gene expression in the locust *Schistocerca* – an antibody that detects conserved epitopes in Ultrabithorax and Abdominal-A proteins. *Dev Genet* 1994; 15: 19-31.
38. Garcia-Fernandez J, Holland PWH. Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene cluster. *Nature* 1994; 370: 563-6.
39. McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992; 68: 283-302.
40. Jacob F. L'irrésistible ascension des gènes Hox. *médecine/sciences* 1994; 10: 145-8.
41. Sordino P, van der Hoeven F, Duboule D. *Hox* gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. *Nature* 1995; 375: 678-81.
42. Scott MP. Molecules and puzzles from the *Antennapedia* homeotic gene complex of *Drosophila*. *Trends Genet* 1985; 1: 74-80.
43. Martin CH, Mayeda CA, Davis CA, et al. Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8398-402.
44. Randazzo FM, Seeger MA, Huss CA, Sweeney MA, Cecil JK, Kaufman TC. Structural changes in the Antennapedia complex of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 1993; 134: 319-30.
45. Ueno K, Hui C-C, Fukuta M, Suzuki Y. Molecular analysis of the deletion mutants in the E homeotic complex of the silkworm *Bombyx mori*. *Development* 1992; 114: 555-63.
46. Beeman RW, Stuart JJ, Brown SJ, Denell RE. Structure and function of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle, *Tribolium castaneum*. *BioEssays* 1993; 15: 439-44.
47. Bürglin TR, Ruvkun G. The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. *Curr Op Genet Dev* 1993; 3: 615-20.
48. Wilson R, Ainscough R, Anderson K, et al. (55 auteurs). 2.2 Mb of continuous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 1994; 368: 32-8.
49. Jarry B, Grau Y. Les gènes programmeurs du développement. *médecine/sciences* 1985; 1: 248-54.

RÉFÉRENCES

50. Duboule D, Morata G. Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet* 1994; 10 : 358-64.
51. Cartwright P, Dick M, Buss LW. HOM/Hox type homeoboxes in the Chelicerate *Limulus polyphemus*. *Mol Phyl Evol* 1993; 2: 185-92.
52. Ito T. Inhibitors of DNA synthesis change the differentiation of body segments and increase the segment number in horseshoe crab embryos (Chelicerata, Arthropoda). *Roux's Arch Dev Biol* 1986; 195: 323-33.
53. Ouweneel WJ. Developmental genetics of homoeosis. *Adv Genet* 1976; 18: 179-248.
54. Brunk BP, Martin EC, Adler PN. *Drosophila* genes *Posterior Sex Combs* and *Suppressor two of zeste* encode proteins with homology to the murine *bmi-1* oncogene. *Nature* 1991; 353: 351-3.
55. Gu Y, Nakamura T, Alder H, et al. The t(4; 11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 1992; 71: 701-8.
56. Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71: 691-700.
57. Kanno M, Hasegawa M, Ishida A, Isono K, Taniguchi M. *mel-18*, a *Polycomb* group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J* 1995; 14: 5672-8.
58. Santamaria P, Randsholt NB. Characterization of a region of the X chromosome of *Drosophila* including *multi sex combs (mxc)*, a Polycomb group gene which also functions as a tumour suppressor. *Mol Gen Genet* 1995; 246: 282-90.
59. Geoffroy Saint-Hilaire E. *Philosophie anatomique, 1^{er} vol. Des organes respiratoires*. Paris : Méquignon-Marvis, 1818.
60. Orr-Weaver TL. Developmental modification of the *Drosophila* cell cycle. *Trends Genet* 1994; 10: 321-7.
61. Breen TR, Duncan IM. Maternal expression of genes that regulate the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 1986; 118: 442-56.
62. Anderson DT. The development of hemimetabolous insects. *Dev Systems Insects* 1972; 1: 95-153.
63. Anderson DT. The development of holometabolous insects. *Dev Systems Insects* 1972; 1: 165-242.
64. Jacob F. *Le jeu des possibles. Essai sur la diversité du vivant*. Paris : Fayard, 1981.
65. Vonallmen G, Hogga I, Spierer A, et al. Splits in fruitfly *Hox* gene complexes. *Nature* 1996; 380: 116.

TIRÉS À PART

J. Deutsch.

Summary

Is the chromatin control of *Hox* genes expression conserved by evolution ?

The maintenance of homeotic gene expression is achieved in *Drosophila* through the activity of two sets of genes, the *Polycomb* and *trithorax* groups. Their mode of action through the formation of chromatin complexes is supported by multiple molecular and genetic evidence. Homologues of these genes are now known in vertebrates. Recent data from transgenesis experiments in mice bring evidence for functional evolutionary conservation of these genes in the control of *Hox* genes' expression. These results are discussed in the light of evolutionary and developmental processes in both arthropod and chordate lineages. Arguments support the involvement of these genes in the temporal, not only spatial, control of the expression of the *Hox* genes and favour the idea that the genomic structure of the *Hox* complexes has been preserved by the effect of this temporal regulation. It is suggested that this chromatin mode of regulation is primitive, and would act in vertebrates and primitive arthropods prior to transcriptional regulation.