

# Organisation spatiale des disques imaginaux et des bourgeons de membre

Julien Royet

Des expériences classiques d'embryologie ont révélé que la morphogenèse du bourgeon de membre des vertébrés est contrôlée par des groupes de cellules aux propriétés organisatrices. Depuis, cette notion de centre organisateur a été étendue aux disques imaginaux, les territoires à partir desquels se forment les membres de la drosophile. L'approche moléculaire a permis de disséquer une partie des mécanismes de formation de ces centres organisateurs et d'identifier des molécules par l'intermédiaire desquelles ils agissent. La comparaison des résultats acquis avec les bourgeons de membre et les disques imaginaux révèle des différences importantes mais témoigne aussi d'une conservation étonnante de certains mécanismes de la morphogenèse des membres des vertébrés et des invertébrés.

**L**es ailes et les pattes de la drosophile sont issues de la différenciation des disques imaginaux. Ce terme désigne des groupes de cellules épithéliales d'origine ectodermique qui se transforment en structures de l'adulte pendant la métamorphose. La formation des bourgeons de membre des vertébrés est un mécanisme plus complexe qui nécessite l'interaction entre deux populations cellulaires ; l'une ectodermique, l'autre mésodermique. Cette différence d'origine embryonnaire a des répercussions importantes sur la forme même des *primordiums*. Alors que les disques imaginaux sont des plans cellulaires monocouches bidimensionnels, les bourgeons de membre sont des structures à trois dimensions. Malgré ces différences fondamentales d'organisation, cer-

taines analogies entre les mécanismes d'organisation spatiale dans les deux systèmes ont récemment été mises à jour.

## Les disques imaginaux

### Les compartiments

C'est en 1973 que Garcia-Bellido a apporté la preuve que les disques imaginaux sont des populations cellulaires hétérogènes, divisées en compartiments [1]. Cette notion découle d'expériences au cours desquelles il a étudié la descendance d'une cellule marquée à un stade très précoce du développement. Le nombre élevé des cellules du disque imaginal de l'aile et la structure plate de l'aile se prêtent parfaitement à ce type d'étude. D'une manière générale, la forme des clones obtenus et leur arrangement

### ADRESSE

J. Royet: *stagiaire postdoctoral*. Laboratoire du Dr Stephen Cohen, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Allemagne.

### TIRÉS À PART

J. Royet.

spatial dans l'aile sont aléatoires. Seuls les clones situés à proximité de la ligne médiane de l'axe antéro-postérieur (A/P) dérogent à cette règle. Leur croissance semble limitée par une ligne de démarcation invisible qui divise l'aile en compartiments postérieur et antérieur, d'où son nom de frontière compartimentale. Les clones sont d'un côté ou de l'autre de cette ligne mais ne la franchissent jamais et la zone de contact entre le clone et la frontière compartimentale est parfaitement rectiligne (figure 1A). De telles frontières ont été mises en évidence entre les compartiments antérieurs et postérieurs de presque tous les disques imaginaux et entre les compartiments dorsaux et ventraux du disque de l'aile (figure 1B).

L'absence de toute barrière structurale observable à la frontière antéro-postérieure du disque a conduit Garcia-Bellido à proposer que cette subdivision pourrait refléter l'expression différentielle de gènes (dits sélecteurs) dans les compartiments. D'après ce modèle, le gène sélecteur est exprimé dans les cellules d'un compartiment auxquelles il confère une identité particulière [2]. Par défaut, les cellules de l'autre compartiment adoptent une identité distincte. Pour expliquer la non-miscibilité des cellules des compartiments, le modèle postule que le gène sélecteur procure des propriétés d'adhérence particulières aux cellules [3]. Ainsi, les cellules dans lesquelles le gène est exprimé, s'agrègent préférentiellement les unes aux autres et ne se mélangent pas aux cellules de l'autre compartiment.

### Les gènes sélecteurs

Les études génétiques et moléculaires des mutations *engrailed* (*en*) et *apterous* (*ap*) ont apporté la confirmation éclatante de l'hypothèse des gènes sélecteurs [4, 5]. Les gènes *ap* et *en* remplissent tous les critères requis pour assurer la fonction de gènes sélecteurs dans le disque de l'aile. Ils codent pour des facteurs de transcription dont les domaines d'expression correspondent exactement aux compartiments postérieur (*en*) et dorsal (*ap*) (figure 1B). Leur transcription est activée avant la mise en place d'une restriction de lignage cellulaire entre compartiments

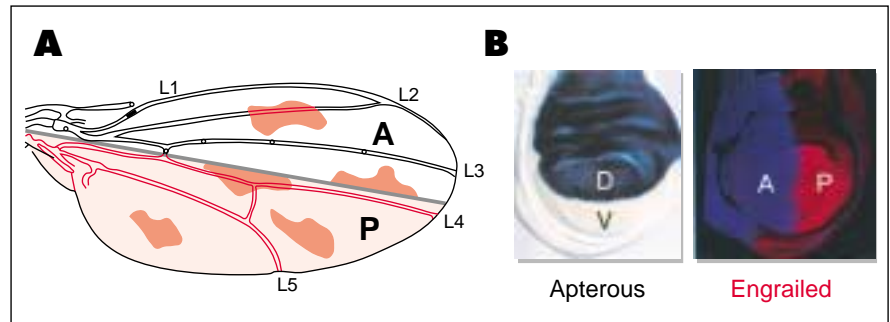


Figure 1. **Compartiments et gènes sélecteurs dans les disques imaginaux.** A. L'aile de la drosophile adulte est divisée en compartiments antérieur (A) et postérieur (P, rose) par la frontière compartimentale (ligne grise). La descendance d'une cellule marquée (ici en rouge) appartient à l'un ou l'autre des compartiments mais jamais aux deux. Les différentes veines sont numérotées de L1 à L5. B. Domaine d'expression des gènes sélecteurs *apterous* et *engrailed*. Le gène *apterous* est exprimé dans le compartiment dorsal (bleu) et *engrailed* dans le compartiment postérieur (rouge) du disque imaginal de l'aile.

(embryogenèse pour *en* et axe antéro-postérieur, second stade larvaire pour *ap* et axe dorso-ventral). Enfin, et surtout, leur présence est nécessaire et suffisante pour conférer une identité postérieure ou dorsale aux cellules dans lesquelles ils sont exprimés [4, 5]. Si le gène *ap* est inactivé dans des cellules du compartiment dorsal, ces dernières perdent leurs caractéristiques dorsales et, par défaut, adoptent une identité ventrale. À l'inverse, l'expression ectopique de *ap* dans les cellules ventrales suffit à les transformer en cellules dorsales. Ce changement d'identité est strictement autonome, c'est-à-dire limité aux cellules dans lesquelles l'activité du gène sélecteur a été modifiée. Des résultats identiques ont été obtenus avec *en*. Une redondance partielle avec le gène *invected* (*inv*) nécessite cependant que les gènes *en* et *inv* soient mutés simultanément pour obtenir une transformation homéotique complète. Le rôle présumé des gènes sélecteurs dans les processus d'adhérence cellulaire semble être aussi assuré par *en* et *ap*. Ainsi, les cellules mutantes pour *apterous* (*ap*-), dans le compartiment dorsal, perdent leur affinité pour les cellules dorsales et se mêlent aux cellules ventrales [5]. Pris dans leur ensemble, ces résultats témoignent du rôle déterminant des gènes sélecteurs dans l'acquisition de l'identité des compartiments et dans la mise en place des frontières qui les séparent.

### L'action non autonome des gènes sélecteurs

Dans le modèle de Garcia-Bellido, les compartiments sont des unités de développement dans lesquelles l'organisation spatiale est strictement autonome. Cela devrait se traduire, au niveau cellulaire, par une action des gènes sélecteurs restreinte aux cellules dans lesquelles ils sont exprimés. L'analyse phénotypique des mutations de *en* et *ap* témoigne, au contraire, d'une composante non autonome de leur fonction. Prenons le cas d'un clone *en-inv*- induit dans le compartiment postérieur: comme le modèle le prévoit, seules les cellules mutantes acquièrent une identité antérieure. Cette transformation homéotique entraîne cependant l'apparition d'un nouveau territoire postérieur, adjacent au clone et composé de cellules non mutantes [6] (figure 2 A). Dans les cas extrêmes, on observe une duplication complète de l'aile avec formation d'un nouvel axe antéro-postérieur. L'identité non mutante des cellules du compartiment postérieur, créé *de novo*, est la preuve de l'action non autonome de *en* et *inv*. De plus, le schéma de répartition des veines dans les ailes surnuméraires indique que ces dernières ont une organisation spatiale identique aux ailes sauvages. La juxtaposition de cellules *en+inv+* et *en-inv*- a donc déclenché la formation d'un centre organisateur capable d'engendrer une nouvelle aile à par-

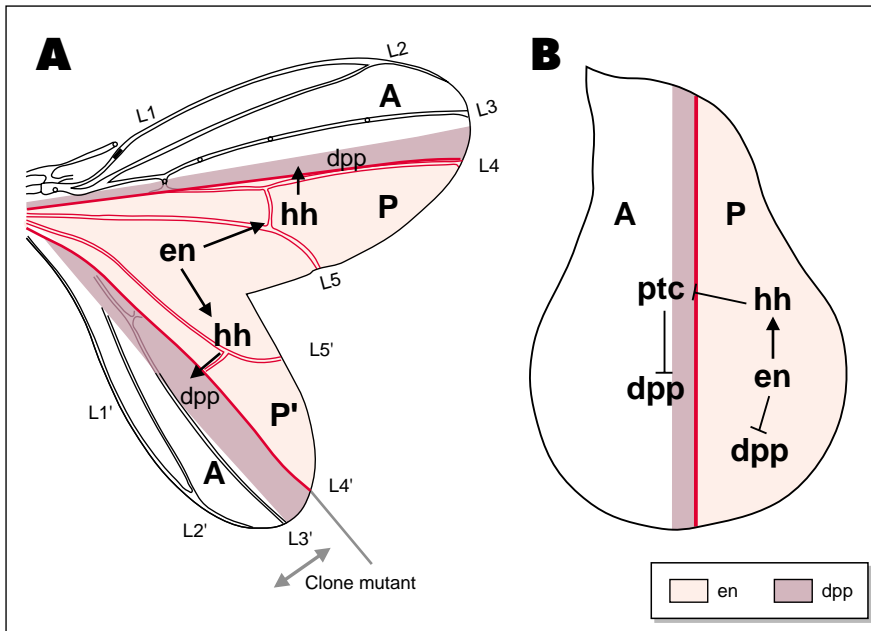


Figure 2. **Effet non autonome des gènes sélecteurs : le cas de engrailed et de invected.** **A.** Phénotype associé à un clone mutant pour engrailed et invected dans le compartiment postérieur. Les cellules mutantes acquièrent une identité antérieure caractérisée par le type de veines qu'elles forment (L1', L2' et L3'). La confrontation des cellules en- inv- et en+ inv+ engendre la production locale de Dpp (en bistre foncé) qui agit sur les cellules adjacentes et induit la formation d'une nouvelle aile. **B.** Modèle d'activation de Dpp dans le disque de l'aile. Dans le compartiment antérieur, Ptc réprime l'activation de dpp. Le facteur En active la transcription de hh dans le compartiment postérieur. Hh franchit par diffusion la frontière A/P et va activer le récepteur Ptc dans les cellules du compartiment antérieur. Hh bloque ainsi la répression de dpp par Ptc et induit la transcription de Dpp le long de la frontière antéro-postérieure. La largeur du domaine d'expression de Dpp dépend de la capacité de diffusion de Hh, elle-même dépendante de Ptc. L'absence de Dpp dans le compartiment postérieur est due à une régulation négative de dpp par En. Enfin, en réprimant l'expression de Ptc, En empêche Hh de transmettre son signal dans le compartiment postérieur.

tir des cellules du clone et des cellules adjacentes sauvages. Ce résultat confirme une hypothèse proposée par Crick, Lawrence et Meinhardt selon laquelle la confrontation entre deux populations cellulaires pourrait induire la production d'un signal local, capable de régler à distance l'organisation spatiale des disques [7, 8].

Ces résultats attribuent une nouvelle fonction aux gènes sélecteurs. Ils contrôlent indirectement la croissance et l'organisation spatiale des disques imaginaux. En engendrant une discontinuité le long de la frontière compartimentale, ils induisent l'apparition d'un centre organisateur qui contrôle, à distance, la croissance et la morphogenèse du disque. Se pose alors la question de la nature

des signaux et de leur lien avec les gènes sélecteurs.

### L'axe antéro-postérieur

Plusieurs données désignent la protéine Decapentaplegic (Dpp) comme molécule organisatrice de l'axe antéro-postérieur. Elle est exprimée dans une bande de quelques cellules, le long de la zone de confrontation entre compartiments. De plus, une source localisée de Dpp suffit à induire la formation d'ailes surnuméraires à partir du disque de l'aile [9, 10]. Enfin, l'activation du gène *dpp* est indirectement contrôlée par le gène *en* dans le disque de l'aile [11]. Engrailed stimule l'expression de la protéine Hedgehog (Hh) dans le compartiment postérieur. Par diffu-

sion, la protéine Hh franchit la frontière compartimentale pour agir sur les cellules antérieures. Dans ces cellules, Hh active *dpp* en réprimant Patched (Ptc), un antagoniste de *dpp* (figure 2B). Simultanément, la répression de *dpp* par En dans le compartiment postérieur délimite le domaine d'expression de *dpp* à une bande de quelques cellules, à la frontière antéro-postérieure. A partir de ce domaine, la protéine Dpp diffuse dans les deux compartiments au sein desquels elle forme un gradient de concentration et active, à distance et en fonction de sa concentration locale, plusieurs gènes cibles comme *optomotor-blind* et *spalt* (*m/s* 1997, n° 11, p. 1347) [12, 13].

### L'axe dorso-ventral

La similitude des propriétés organisatrices de Dpp pour l'axe antéro-postérieur et de Wingless (Wg) pour l'axe dorso-ventral est frappante : mêmes restrictions du domaine d'expression à la frontière compartimentale, mêmes capacités à engendrer la formation d'ailes surnuméraires [14], enfin, mêmes modes d'action avec formation d'un gradient de concentration et activation des gènes cibles *distalless* et *vestigial* (*m/s* 1997, n° 11, p. 1347) [15, 16]. Dans les deux cas, il est essentiel que le domaine d'expression de ces morphogènes soit restreint à la frontière compartimentale.

L'activation de *wg* est sous le double contrôle du facteur de transcription Ap et du récepteur Notch (N). La création d'une interface *ap+/ap-* induit l'expression de *wg* à la frontière ainsi créée. Parallèlement, l'utilisation d'allèles de N, nuls ou constitutivement actifs, indique que l'activation du récepteur Notch est nécessaire et suffisante pour déclencher la transcription de *wg* [14]. Sachant que Notch est exprimé dans toutes les cellules du disque et que ses ligands, Serrate (Ser) et Delta (DI), sont respectivement présents dans les compartiments dorsaux et ventraux, comment l'expression de Wg peut-elle donc être limitée à la frontière compartimentale ? L'étude du gène *fringe* (*fng*) a permis d'éclaircir ce paradoxe et d'intégrer les rôles de N et de Ap (figure 3). Le gène *fringe* est exprimé dans le comparti-

ment dorsal sous le contrôle transcriptionnel de *ap* [17]. La création d'une interface *fng*<sup>+</sup>/*fng*<sup>-</sup> suffit à déclencher l'activation de *wg*, suggérant que, dans ce processus, *fng* est le gène effecteur de *Ap* [18]. La protéine Fng agit en modifiant la capacité de *Ser* et *DI* à activer *N* [19]. En présence de Fng, *Ser* devient un ligand inefficace alors que la capacité de *DI* à activer *N* est accrue. Les cellules dorsales qui expriment Fng et *Ser* ne peuvent donc activer *N*. Seules les cellules ventrales le long de la frontière D/V, et donc en contact direct avec les cellules dorsales, répondent au signal de *Ser* et activent la transcription de *wg*. L'absence de protéine Fng dans le compartiment ventral empêche l'activation de

*N* par *DI*. En revanche, les cellules dorsales le long de la frontière dorso-ventrale répondent au signal *DI* émis par les cellules ventrales. En modulant l'affinité de *N* pour ses ligands, Fng crée une zone d'activation maximale de *N* confinée à la frontière compartimentale. Les mécanismes par lesquels la protéine Fng altère les effets de *Ser* et *DI* sur *N* demeurent encore inconnus.

Les gènes sélecteurs *ap* et *en* contrôlent donc l'organisation des axes antéro-postérieur et dorso-ventral du disque de manière très similaire. Dans un premier temps, ils établissent une asymétrie dans le disque imaginal en créant deux populations cellulaires distinctes : les compartiments. Par la suite, par le biais de

l'activation de *Hh* pour l'axe antéro-postérieur et de *Fng* pour l'axe dorso-ventral, les gènes *en* et *ap* assurent l'activation de *Dpp* et de *Wg* dans un domaine limité à la frontière compartimentale.

### Le maintien de l'intégrité de la frontière compartimentale

L'analyse microscopique de clones mutants pour *engrailed* indique que ce gène joue un rôle pivot dans le maintien de l'intégrité de la frontière compartimentale A/P. Alors que les clones mutants pour un gène quelconque ont une forme irrégulière, les clones *en*<sup>-</sup> sont presque circulaires, comme si les cellules mutantes cherchaient à minimiser la surface de contact avec les cellules qui les entourent [4, 20]. Lorsque ces clones sont induits près de la frontière antéro-postérieure, les cellules du clone se mêlent aux cellules antérieures alors qu'elles forment une ligne de partage bien marquée avec les cellules *en*<sup>+</sup>.

Deux caractéristiques distinguent les cellules présentes de part et d'autre de la frontière antéro-postérieure. Les cellules postérieures synthétisent *En* mais ne reçoivent pas le signal de *Hh* du fait de l'absence de *Ptc*, le récepteur de *Hh*, réprimé par *En*. En revanche, les cellules antérieures, proches de la frontière compartimentale, sont *en*<sup>-</sup> mais sont activées par *Hh*. Le maintien de la frontière peut donc résulter de la non-miscibilité entre cellules *en*<sup>+</sup>/*en*<sup>-</sup> ou entre cellules qui reçoivent ou non le signal de *Hh*. Pour tester ces deux possibilités, les équipes de Blair et de Basler ont étudié le comportement de clones antérieurs, mutants pour *smoothened* (*smo*), une molécule nécessaire à la réception du signal de *Hh*. Ces cellules *smo*<sup>-</sup> ne peuvent plus répondre au signal de *Hh* et n'expriment pas *en* [21, 22]. Si le maintien de la frontière est lié à la capacité des cellules à recevoir le signal *Hh*, les clones *smo*<sup>-</sup> devraient franchir la frontière et se mélanger aux cellules postérieures. Si, au contraire, *En* agit indépendamment de *Hh*, les clones *smo*<sup>-</sup> doivent respecter la limite compartimentale. Les expériences montrent que les clones *smo*<sup>-</sup>, induits dans le compartiment antérieur, peuvent transgresser la limite compartimentale sans activer la transcription de *en*

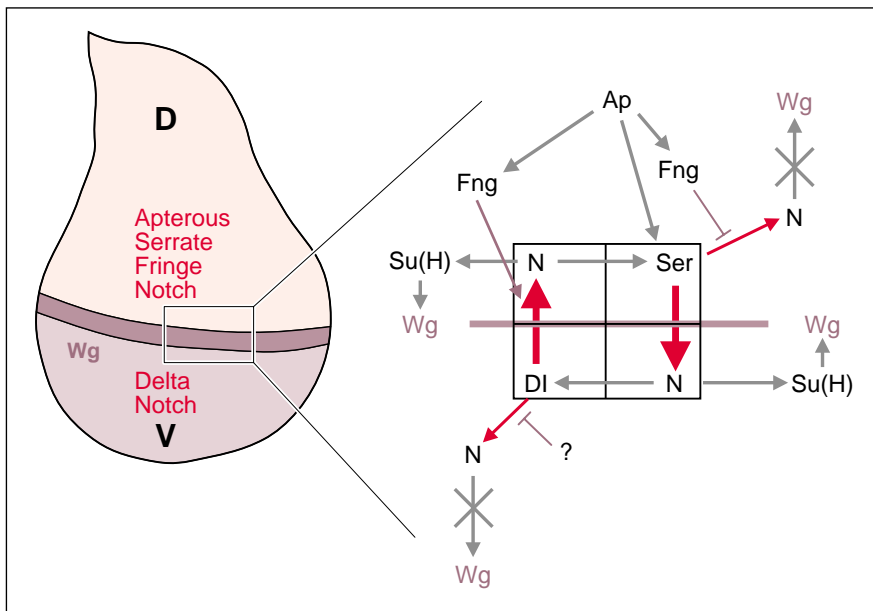


Figure 3. **Mécanisme d'activation de *Wg* à la frontière dorso-ventrale du disque de l'aile.** Alors que *Notch* est présent dans tout le disque imaginal, *Ser* et *DI* sont uniquement synthétisées respectivement dans les compartiments dorsal et ventral. Dans le compartiment dorsal, la transcription de *fng* et de *Ser* dépend de *Ap*. La présence de *Fng* empêche l'activation de *N* par *Ser*. En revanche, les cellules situées le long de la frontière dorso-ventrale qui expriment *N* et *Fng*, peuvent répondre au signal de *Delta* provenant des cellules ventrales. De même, les cellules ventrales le long de la frontière dorso-ventrale qui expriment *N* mais pas *Fng*, peuvent répondre au signal de *Ser* venu des cellules dorsales. L'effet de *Ser* et *DI* est limité aux cellules de part et d'autre de la frontière car ce sont des molécules membranaires capables de transmettre leur signal uniquement aux cellules directement adjacentes. Cet effet est amplifié du fait de l'activation du signal *N* qui stimule la production de ses propres ligands *Ser* et *DI*. Par ces mécanismes, l'activation maximale du récepteur *Notch* est obtenue uniquement à la frontière. Cela explique le domaine d'expression de *Wg*. La nature du signal qui empêche l'activation de *N* par *DI* dans le compartiment ventral est inconnue. Les flèches rouges correspondent à des interactions ligand-récepteur et les flèches en bistre clair à la modification d'affinité des ligands pour le récepteur.

(figure 4). Le maintien de la frontière antéro-postérieure dépend donc de la capacité des cellules à recevoir le signal de Hh. Notons que, d'après les résultats de Blair, les clones *smo-* ne se mélangent pas parfaitement aux cellules du compartiment postérieur. L'affinité cellulaire pourrait donc aussi dépendre d'autres fonctions de En, indépendantes de Hh.

### Alternative aux gènes sélecteurs

Le rôle des gènes sélecteurs et des compartiments décrits précédemment ne s'applique pas à l'ensemble des plans de symétrie des disques imaginaux. Pour l'axe dorso-ventral du disque de la patte, deux arguments vont en effet à l'encontre d'un rôle exercé par un gène sélecteur. La restriction de lignage cellulaire entre cellules ventrales et cellules dorsales du disque de la patte est beaucoup

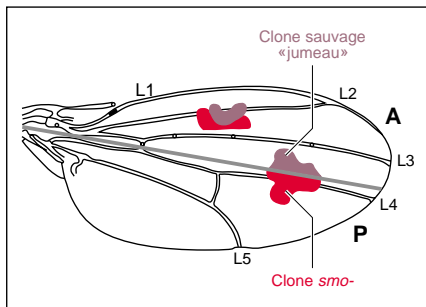


Figure 4. **Maintien de l'intégrité de la frontière compartimentale.** Des clones mutants pour *smoothed* sont induits dans le disque de l'aile à un stade de développement où la frontière antéro-postérieure est déjà établie. Les clones sont induits par recombinaison homologue dans des cellules hétérozygotes pour *smo*. Une cellule qui a subi un événement de recombinaison va donner naissance à deux cellules filles: l'une homozygote pour *smo* et l'autre sauvage. En marquant la cellule sauvage (dont la descendance ne peut franchir la frontière compartimentale), on peut déterminer le compartiment dans lequel le clone a été induit. Ainsi, certains clones *smo-* créés dans le compartiment antérieur (car les cellules sauvages du clone «sœur» sont dans le compartiment antérieur) peuvent franchir la frontière antéro-postérieure et se mêler aux cellules du compartiment postérieur.

moins stricte que celle observée pour l'axe antéro-postérieur. De plus, aucun gène ou marqueur avec un domaine d'expression correspondant aux secteurs dorsaux ou ventraux n'a pu être isolé. Au contraire, la mise en place et le maintien de l'axe dorso-ventral dans le disque de la patte semblent être assurés par une répression mutuelle entre les gènes *wg* et *dpp* [23-25]. Le schéma global d'organisation des disques de la patte et de l'aile se ressemble. Dans les deux cas, la protéine Hh est produite sous le contrôle de En dans les cellules postérieures et diffuse dans le compartiment antérieur au sein duquel elle règle l'activation de gènes cibles. Dans le cas de la patte, Hh active la transcription de *wg* dans la partie ventrale et de *dpp* dans la partie dorsale du disque (figure 5). L'analyse phénotypique des mutants de *wg* et de *dpp* indique que ces gènes sont respectivement nécessaires à la formation des structures ventrales et dorsales de la patte. Par la suite, une répression mutuelle entre ces deux gènes permet le maintien de leur domaine d'expression et, de ce fait, de la polarité dorso-ventrale. Une diminution d'activité de *wg* entraîne une expansion du domaine d'expression de *dpp* dans le disque et, par conséquent, des structures dorsales de la patte. La réduction de l'activité de *dpp* provoque des phénotypes opposés. Comme pour En et Ap, la présence de Wg et Dpp suffit donc à conférer une identité propre aux cellules. Deux caractéristiques distinguent néanmoins *wg* et *dpp* des gènes sélecteurs comme *en* ou *ap*. Les gènes *wg* et *dpp* ne sont exprimés que dans des sous-populations des secteurs ventraux ou dorsaux du disque et ils codent pour des protéines sécrétées qui, par définition, exercent une action non autonome.

Ce type d'organisation spatiale, en l'absence de compartiments et de gènes sélecteurs, est également utilisé dans le disque imaginal oculaire [26]. Ce disque, d'où sont issus l'œil et le reste de la tête (vertex), ne présente aucune restriction de lignage cellulaire entre les territoires d'origine de ces structures. Ici encore, les analyses clonales attribuent à l'antagonisme Dpp-Wg un rôle essentiel à l'organisation spatiale du disque. Les protéines Dpp et Wg sont exprimées

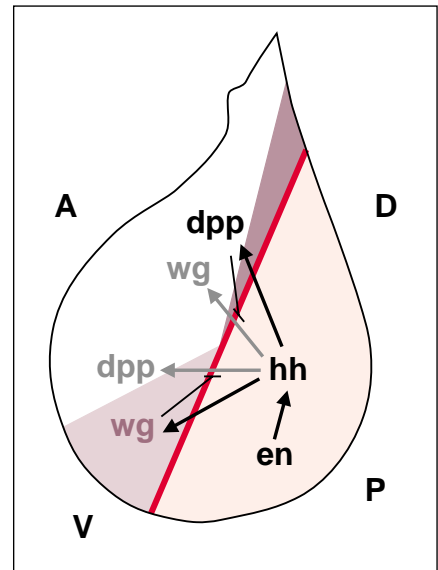


Figure 5. **Organisation spatiale en l'absence de gènes sélecteurs.** Dans le disque de la patte, la protéine Hh induit l'expression de Dpp et Wg respectivement dans les régions antérieures dorsale et ventrale. Simultanément, Wg empêche Hh d'activer Dpp dans les cellules ventrales et réciproquement. Cet antagonisme maintient la polarité dorso-ventrale dans le disque de la patte.

respectivement dans les territoires d'origine de l'œil et du vertex. L'activation ectopique des signaux de transduction de Wg et Dpp suffit à induire la formation de structures de l'œil ou du vertex aux dépens les unes des autres. Enfin, la réduction d'activité d'un des gènes provoque l'activation ectopique de l'autre et, de ce fait, une modification du rapport entre l'œil et le vertex chez la drosophile adulte. Dans ce cas, l'antagonisme Dpp-Wg assure une bonne répartition entre deux structures fonctionnelles distinctes.

### Les bourgeons de membre

L'embryon de poulet se prête particulièrement bien aux expériences de micromanipulation telles que les greffes de tissus, les ablations ou encore les transplantations cellulaires. Cette propriété en a fait un modèle privilégié pour l'étude de l'embryologie des vertébrés et, plus particulièrement, de la morphogène-

nèse des membres. Ainsi, la plupart des résultats présentés dans cet article ont été obtenus à partir d'embryons de poulet mais peuvent sans doute être, en grande partie, extrapolés aux autres tétrapodes.

Les bourgeons de membre des vertébrés se forment à la suite d'inductions réciproques entre le mésoderme des plaques latérales et l'ectoderme qui le recouvre. De par leur origine embryologique, les bourgeons de membre se distinguent donc des disques imaginaires qui ne sont formés que de cellules ectodermiques. Les bourgeons sont issus d'une condensation des cellules du mésoderme latéral qui forment des renflements aux futurs emplacements des ailes et des pattes de l'embryon. A l'extrémité de ces bourgeons, un groupe de cellules mésenchymateuses en état de prolifération, appelé *progress zone*, induit dans l'ectoderme la formation d'une bande de cellules épithéliales spécialisées: la crête apicale ectodermique. Ce « bourrelet » cellulaire court le long de l'axe antéro-postérieur, à l'interface entre les territoires dorsal et ventral du bourgeon de membre. Nombreuses sont les expériences qui montrent que la croissance du bourgeon est dépendante d'un échange d'informations entre la crête apicale ectodermique et la *progress zone*. Ainsi, l'ablation de la crête apicale ectodermique bloque la prolifération des cellules du mésoderme sous-jacent et conduit à la formation de membres dont les parties distales sont tronquées. A l'inverse, la juxtaposition des ectodermes ventral et dorsal permet la formation d'une crête apicale ectodermique ectopique dont la seule présence suffit à induire l'apparition d'un nouveau bourgeon. La capacité de la crête apicale ectodermique à induire la formation de membres ectopiques lui confère un rôle de centre organisateur qui rappelle celui de la frontière intercompartimentale dorso-ventrale du disque imaginal de l'aile de drosophile. Il est, dès lors, intéressant de dresser un parallèle entre les mécanismes de mise en place de ces centres organisateurs et de comparer les signaux moléculaires avec lesquels ils contrôlent l'organisation spatiale du disque et du bourgeon.

### **Polarité dorso-ventrale et crête apicale ectodermique**

Dès les années 1970, il a été clairement établi que la polarité dorso-ventrale du bourgeon de membre résultait d'interactions entre l'ectoderme et le mésoderme. Si la polarité dorso-ventrale de l'ectoderme d'un bourgeon de membre est inversée par micromanipulation, on observe une inversion de la polarité du mésoderme sous-jacent. La formation de l'axe dorso-ventral du mésoderme est donc sous l'influence de signaux produits par les cellules de l'ectoderme. Dans deux études récentes, les équipes de Le Douarin et de Tickle ont recherché l'origine de la polarité dorso-ventrale de l'ectoderme [27, 28]. Ces auteurs montrent qu'une rotation de 180° du territoire d'origine du bourgeon de membre d'un embryon au stade HH13 (avant même que le bourgeon ne soit visible) conduit à la formation d'un membre dont la polarité dorso-ventrale est normale alors que sa polarité antéro-postérieure est inversée [27]. A un stade de développement auquel l'axe antéro-postérieur est déjà déterminé, la polarité dorso-ventrale du bourgeon demeure sous l'influence de facteurs extérieurs au bourgeon. En vue de préciser l'origine embryonnaire de ces activités polarisantes, le territoire d'origine du bourgeon a été inséré entre deux somites ou bien isolé de l'influence du mésoderme latéral somatopleural à l'aide d'un filtre. Dans les deux types d'expérience, les membres formés ont été bidorsaux [27]. Les auteurs ont déduit que la polarité dorso-ventrale du bourgeon résulte d'un antagonisme entre un signal dorsalisant produit par les somites et un signal ventralisant provenant de la somatopleure latérale. Il reste à déterminer si ces messages agissent directement sur l'ectoderme ou si leur action est relayée par le mésoderme du bourgeon.

Longtemps sujette à débats, l'origine exacte des cellules qui composent la crête apicale ectodermique a récemment été élucidée. Par des expériences de greffes hétérologues de cellules de caille dans l'embryon de poulet, le territoire d'origine de la crête apicale ectodermique a été localisé à un domaine, de 150 µm environ, recouvrant l'ensemble du

territoire d'origine mésodermique du bourgeon [27]. En utilisant une technique de marquage des cellules avec un colorant vital (DiI) qui permet de suivre le devenir des cellules, l'équipe de Tickle a étudié les liens entre la crête apicale ectodermique et les ectodermes ventral et dorsal [28]. Trois résultats importants ressortent de cette étude. D'une part, la crête apicale ectodermique a une origine complexe et est composée par l'association de cellules ectodermiques ventrales et dorsales. D'autre part, lorsqu'une cellule de l'ectoderme ventral est marquée par le colorant DiI, sa descendance reste confinée à l'ectoderme ventral. Il en est de même pour les cellules de l'ectoderme dorsal. Il existe donc une restriction clonale entre les parties dorsale et ventrale de l'ectoderme, une caractéristique que ne possède pas le mésoderme. Enfin, c'est précisément à la zone de confrontation entre les ectodermes dorsal et ventral que se forme la crête apicale ectodermique.

Ces résultats sont remarquables car ils démontrent, pour la première fois, l'existence de compartiments dans le bourgeon de membre. Jusqu'à présent, seuls les rhombomères du système nerveux central de l'embryon étaient assimilés à des compartiments [29]. Par ailleurs, comme pour le disque de l'aile de drosophile, la limite de confrontation des compartiments de l'ectoderme du bourgeon délimite l'emplacement de la future crête apicale ectodermique, le centre organisateur du membre. Notons néanmoins que l'analyse phénotypique des mutants *Eudiplopodia* indique que les deux phénomènes peuvent être dissociés. Les bourgeons de membre de ces mutants présentent des crêtes apicales ectodermiques ectopiques au sein même de l'ectoderme dorsal [30].

L'axe dorso-ventral du bourgeon semble donc être formé par une succession de trois étapes semblables à celles décrites pour le disque imaginal: l'apparition d'une asymétrie entre deux populations cellulaires, la formation d'un centre organisateur à l'interface de ces populations et, enfin, le contrôle de la morphogénèse du membre (disque ou bourgeon) par la (ou les) molécule(s) à activité organisatrice.

## Rôle du gène *Radical fringe* dans la mise en place de la crête apicale ectodermique

Le centre organisateur de l'axe dorso-ventral du disque imaginal de l'aile est formé, nous l'avons vu, par la confrontation de cellules *fng*<sup>+</sup> et *fng*<sup>-</sup>. Afin d'étudier leurs rôles éventuels dans la mise en place de la crête apicale ectodermique, plusieurs gènes *fng* ont été clonés chez le poulet et chez la souris. Un ensemble de données indique que l'un des gènes orthologues de *fng*, appelé *Radical fringe* (*R-fng*), joue un rôle essentiel dans la formation de la crête apicale ectodermique du bourgeon de membre de poulet. Les expériences d'hybridation *in situ* révèlent que l'ARNm de *R-fng* est présent dans l'ectoderme dorsal mais absent de l'ectoderme ventral. Plus significatif encore, la création de nouvelles frontières *R-fng*<sup>+</sup>/*R-fng*<sup>-</sup> provoque la formation de crêtes apicales ectodermiques ectopiques et, inversement, l'élimination de la frontière endogène conduit à la perte de la crête apicale

ectodermique. L'asymétrie entre cellules *R-fng*<sup>+</sup> et *R-fng*<sup>-</sup> est donc une condition nécessaire et suffisante à la formation de la crête apicale ectodermique dans l'ectoderme [31, 32]. La cascade moléculaire qui définit l'emplacement du centre organisateur dorso-ventral dans le disque de l'aile est donc utilisée, au moins en partie, pour localiser la crête apicale ectodermique dans l'ectoderme du bourgeon (figure 6). Il reste néanmoins à démontrer si *R-Fng* définit la position de la crête apicale ectodermique en modifiant la sensibilité de Notch pour ses ligands, comme cela a été démontré chez la drosophile. Cette possibilité est envisageable dans la mesure où certains gènes orthologues de *Notch* et de *Serrate* sont exprimés dans la crête apicale ectodermique. Enfin, le fait que les souris mutantes *Syndactylism* présentent des hypertrophies de la crête apicale ectodermique – dues à des mutations du gène *Serrate-2* – témoigne de l'importance du signal de transduction de Notch dans la formation de la crête apicale ectodermique [33].

## Différences entre vertébrés et invertébrés

Si les ressemblances entre disques imaginaux et bourgeons de membre sont évidentes, d'importantes différences n'en demeurent pas moins. Intéressons-nous à la nature du signal moléculaire produit par les centres organisateurs et aux mécanismes qui contrôlent l'expression de *fng* dans le compartiment dorsal.

L'expression de *fng* dans le disque de l'aile est activée par Ap, une protéine contenant un domaine LIM et une boîte homéotique. Parmi les gènes de la famille de *apterous* clonés chez les vertébrés, aucun n'a un domaine d'expression compatible avec une activité régulatrice sur *R-fng*. Cette fonction est en fait assurée par le gène *Engrailed-1*, orthologue du gène *en* de drosophile. *En-1* est présent dans l'ectoderme ventral et peut, si on l'exprime dans le compartiment dorsal, réprimer l'expression de *R-fng* chez le poulet [31, 32]. De plus, chez les souris mutantes pour *En-1*, *R-Fng* est exprimé de manière ectopique

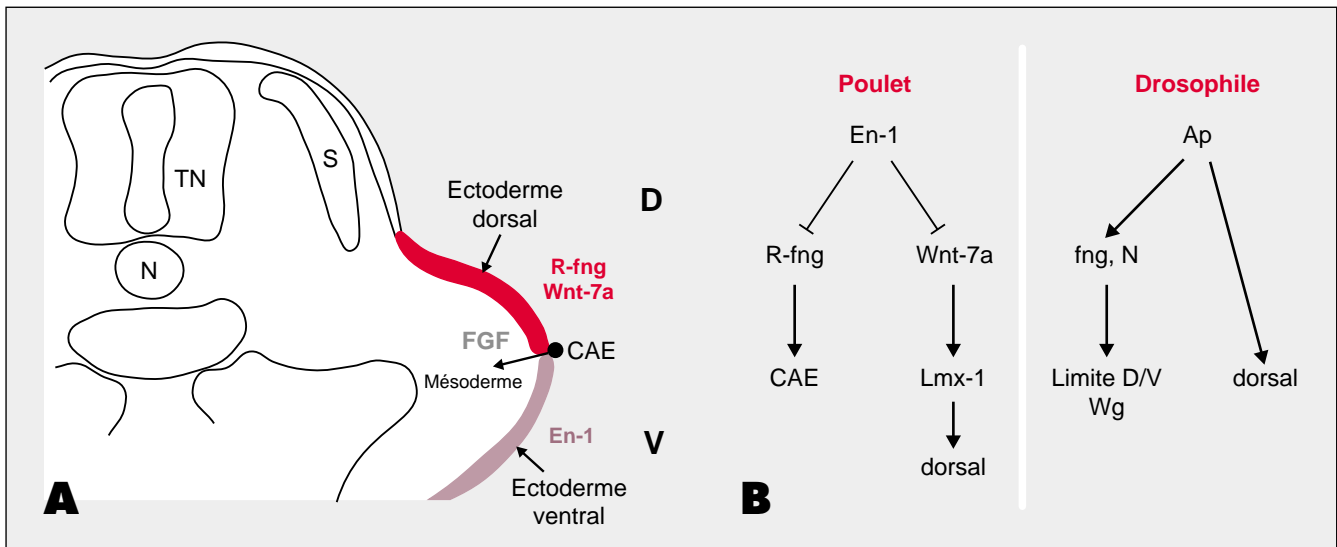


Figure 6. **Organisation dorso-ventrale dans le bourgeon de membre.** **A.** Coupe transversale d'un embryon de poulet. La crête apicale ectodermique (CAE) apparaît à l'intersection des ectodermes ventral et dorsal. Une fois la crête apicale ectodermique mise en place, elle induit la prolifération du mésoderme sous-jacent par le biais de la production de molécules de la famille des FGF (fibroblast growth factor). TN: tube neural; N: notochorde; S: somite. **B.** Comparaison des mécanismes de mise en place des centres organisateurs de l'axe dorso-ventral dans le disque de l'aile et le bourgeon de membre. Dans les deux systèmes, un même gène assure la formation du centre organisateur et confère l'identité dorsale. Chez les vertébrés, *En-1* définit les domaines d'expression de *R-fng* et de *Wnt-7a* en empêchant leur activation dans l'ectoderme ventral. L'interaction entre cellules *R-fng*<sup>+</sup> et *R-fng*<sup>-</sup> sert de signal pour la localisation de la crête apicale ectodermique. Indépendamment, *Wnt-7a* donne aux cellules dorsales leur identité à la fois dans l'ectoderme et dans le mésoderme par le biais de l'activation de *Lmx-1*. Dans le disque imaginal, les cellules qui expriment *apterous* adoptent une identité dorsale par un mécanisme encore inconnu. Indépendamment, *apterous* active *fng* et contrôle ainsi la formation du centre organisateur dorso-ventral (expression de *wg*).

dans l'ectoderme ventral [34]. *En-1* délimite donc le domaine d'expression de *fng* en empêchant sa transcription dans les cellules ventrales. Comme pour *ap* dans le disque, *en* règle aussi indirectement l'identité dorsale et ventrale des cellules du bourgeon de membre. Le gène *Wnt-7a* confère aux cellules de l'ectoderme qui l'expriment un caractère dorsal [35]. De plus, en induisant l'expression de *Lmx-1* dans le mésoderme sous-jacent, *Wnt-7a* détermine aussi la polarité dorso-ventrale du mésoderme [36]. Or, il a été montré que *En-1* empêche l'activation de *Wnt-7a* dans l'ectoderme ventral, limitant son domaine d'expression et donc son action à la partie dorsale du membre (figure 6). *En* et *ap* jouent donc un rôle semblable dans les deux systèmes; l'un comme activateur, l'autre comme répresseur. Contrairement au gène *en* de drosophile, aucune fonction n'a pu être assignée au gène *En-1* dans la polarité antéro-postérieure du bourgeon de membre. La nature moléculaire du signal produit par le centre organisateur distingue également des imaginaux et bourgeons de membre. Le rôle de molécule organisatrice, assuré par *Wg* dans le disque de l'aile semble revenir à des molécules de la famille des FGF (*fibroblast growth factor*) dans la crête apicale ectodermique. Certains FGF sont exprimés très tôt dans le domaine d'origine de la crête apicale ectodermique et une source localisée de FGF peut restaurer la croissance des bourgeons de membre dans lesquels la crête apicale ectodermique a été éliminée [37]. A ce jour, aucun rôle essentiel n'a pu être attribué aux molécules de type FGF dans l'organisation des disques imaginaux de drosophile.

### L'axe antéro-postérieur

Nombreux sont les travaux portant sur l'organisation de l'axe antéro-postérieur du bourgeon (pour revue, voir [38]). Pour rester dans le cadre d'une comparaison entre disques et bourgeons, je passerai volontairement sous silence de nombreux aspects importants dans la formation de l'axe antéro-postérieur comme par exemple le rôle des gènes *Hox* (pour revue, voir [38]). La formation de l'axe antéro-postérieur du bourgeon démontre, une

fois encore, la richesse des résultats acquis par les expériences d'embryologie dite classique. Des expériences de greffes ont montré, depuis fort longtemps, les propriétés exceptionnelles d'un groupe de cellules du mésenchyme postérieur du bourgeon appelé ZAP (zone d'activité polarisante). Greffées dans des positions plus antérieures, ces cellules provoquent des duplications du membre le long de l'axe antéro-postérieur. La grande partie des territoires dupliqués ne provient pas de cellules de la greffe mais de cellules de l'hôte. Cela met en évidence la capacité organisatrice des cellules de la ZAP qui agissent de manière non autonome. Deux types d'expériences permettent de conclure que la molécule Sonic Hedgehog (SHh) est le signal moléculaire présent dans la ZAP. L'ARNm de *Shh* est exprimé dans le territoire d'origine de la ZAP et l'implantation de cellules exprimant l'ADNc de *Shh* provoque des duplications identiques à celles obtenues avec la ZAP [39, 40]. Ces expériences tendent à démontrer que la fonction de *Shh* dans le bourgeon est semblable à celle décrite pour le gène orthologue *hh* dans le disque. Notons néanmoins que, dans le disque de l'aile, l'activité organisatrice de Hh est relayée en grande partie par la protéine Dpp [12, 13]. Deux modèles ont été avancés pour expliquer le mode d'action de SHh dans le bourgeon de membre. Dans le premier, la protéine SHh est exprimée sous forme d'un gradient de concentration. L'identité des structures formées le long de l'axe antéro-postérieur est déterminée par les concentrations locales de Hh. La protéine Hh est alors un morphogène au sens strict. Dans le second modèle, Hh agit localement en déclenchant la production d'une ou plusieurs molécules qui, à leur tour, règlent la formation de l'axe antéro-postérieur. Par analogie avec le rôle de Dpp dans le disque, il a été proposé que l'action de SHh puisse être relayée par une ou plusieurs protéines de la famille des TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), comme par exemple les BMP (*bone morphogenetic protein*). Cependant, jusqu'à présent, aucun des deux modèles n'a pu être formellement démontré. Le clonage et l'analyse fonctionnelle des gènes impliqués

dans les cascades de transduction de *SHh* et des *BMP* devraient permettre de répondre à cette question.

## Conclusions

C'est en 1822 que Geoffroy Saint-Hilaire a émis l'hypothèse d'une conservation de certains mécanismes du développement réglant la formation des embryons de vertébrés et d'invertébrés [41]. Ces dernières années, plusieurs études ont remis cette idée au goût du jour. L'équipe de De Robertis a, par exemple, démontré l'extraordinaire conservation du mode d'action des protéines Chordin/BMP chez les vertébrés et Dpp/Sog chez la drosophile dans la mise en place de l'axe dorso-ventral de l'embryon [42]. Plus récemment, l'analyse du domaine d'expression du gène *Hairy*, chez le poulet et chez le poisson, a confirmé l'idée selon laquelle la segmentation de l'embryon de drosophile et la somitogenèse des vertébrés utilisent des mécanismes moléculaires communs [43, 44]. Enfin, malgré d'importantes divergences, il apparaît qu'au cours des 500 millions d'années qui séparent les arthropodes des chordés, certains mécanismes cellulaires et moléculaires de la morphogenèse des disques imaginaux et des bourgeons de membre ont été remarquablement conservés ■

### Remerciements

Je tiens à remercier Anne Laverrière, Thomas Lecuit et Rolf Zeller pour leurs commentaires sur le manuscrit.

### RÉFÉRENCES

1. Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G. Developmental compartmentalisation of the wing disc of *Drosophila*. *Nat New Biol* 1973; 245: 251-3.
2. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978; 276: 565-70.
3. Garcia-Bellido A. Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *CIBA Foundation Symp* 1975; 29: 161-83.
4. Morata G, Lawrence P. Control of compartment development by the *engrailed* gene in *Drosophila*. *Nature* 1975; 255: 614-7.
5. Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Interactions between dorsal and ventral cells in the imaginal disc direct wing development in *Drosophila*. *Cell* 1993; 75: 741-52.



## RÉFÉRENCES

6. Tabata T, Schwartz C, Gustavson E, Ali Z, Kornberg TB. Creating a *Drosophila* wing *de novo*, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* 1995; 121: 3359-69.
7. Crick FH, Lawrence P. Compartments and polyclones in insect development. *Science* 1975; 189: 340-7.
8. Meinhardt H. Cell determination boundaries as organizing region for secondary embryonic fields. *Dev Biol* 1983; 96: 375-85.
9. Zecca M, Basler K, Struhl G. Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 1995; 121: 2265-78.
10. Basler K, Struhl G. Compartments boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 1994; 368: 208-14.
11. Capdevilla J, Guerrero I. Targeted expression of the signalling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* 1994; 13: 4459-68.
12. Nellen D, Burke R, Struhl G, Basler K. Direct and long range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 1996; 85: 357-68.
13. Lecuit T, Brook WJ, Ng M, Callega M, Sun H, Cohen SM. Two distinct mechanisms for long range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* 1996; 381: 387-93.
14. Diaz-Benjumea FJ, Cohen SM. Serrate signals through Notch to establish a Wingless dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 1995; 121: 4215-25.
15. Neumann CJ, Cohen SM. Long-range action of Wingless organizes the dorso-ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* 1997; 124: 871-80.
16. Zecca M, Basler K, Struhl G. Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* 1996; 87: 833-44.
17. Irvine KD, Wieschaus E. *Fringe*, a boundary specific signalling molecule mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 1994; 79: 595-606.
18. Kim J, Irvine KD, Carroll SB. Cell recognition, signal induction and symmetrical gene activation at the dorso-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* 1995; 82: 795-802.
19. Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. *Fringe* modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 1997; 387: 908-12.
20. Lawrence P, Struhl G. Further studies of the engrailed phenotype in *Drosophila*. *EMBO J* 1982; 1: 827-33.
21. Blair SS, Ralston A. Smoothed-mediated Hedgehog signalling for the maintenance of the antero-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 1997; 124: 4053-63.
22. Rodriguez I, Basler K. Control of compartmental affinity boundaries by Hedgehog. *Nature* 1997; 389: 614-8.
23. Jiang J, Struhl G. Complementary and mutually exclusive activities of decapentaplegic and wingless organize axial patterning during *Drosophila* leg development. *Cell* 1996; 86: 401-9.
24. Penton A, Hoffman FM. Decapentaplegic restricts the domain of wingless during *Drosophila* limb patterning. *Nature* 1996; 382: 162-4.
25. Brook WJ, Cohen SM. Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* 1996; 273: 1373-7.
26. Royet J, Finkelstein R. Establishing primordia in the *Drosophila* eye-antennal imaginal disc: the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development* 1997; 124: 4793-800.
27. Michaud JL, Lapointe F, Le Douarin. The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and lateral somatopleure. *Development* 1997; 124: 1453-63.
28. Altabel M, Clarke JDW, Tickle C. Dorsoventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 1997; 124: 4547-56.
29. Lumsden A. The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. *Trend Neurosci* 1990; 13: 329-55.
30. Carrington JL, Fallon JF. Experimental manipulation leading to induction of dorsal ectodermal ridge on normal limbs results in a phenocopy of the Eudiplopodia chick mutant. *Dev Biol* 1996; 116: 130-7.
31. Rodriguez-Esteban C, Schwabe JWR, De la Penta J, Foy B, Eschelmann B, Belmonte JCI. Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 1997; 386: 360-6.
32. Laufer E, Dahn R, Orozco OE, Yeo CY, Pisenti J, Henrique D, Abbott UK, Fallon JF, Tabin C. Expression of Radical fringe in limb bud ectoderm regulates apical ectoderm ridge formation. *Nature* 1997; 386: 366-373.
33. Sidow A, Bulotsky MS, Kerrebrock AW, Bronson RT, Daly MJ, Reeve MP, Hawkins TL, Birren BW, Jaenisch R, Lander E. *Serrate 2* is disrupted in the mouse limb-development mutant syndactylism. *Nature* 1997; 389: 722-4.
34. Logan C, Hornbruch A, Campbell I, Lumsden A. The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* 1997; 124: 2317-24.
35. 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.
36. Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessel TM, Tabin C. Induction of the LIM homeobox gene *limx1* by Wnt-7a establishes dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Cell* 1995; 83: 631-40.
37. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 1993; 75: 579-87.
38. Johnson R, Tabin C. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997; 90: 979-90.
39. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 1993; 75: 1401-6.
40. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 1993; 75: 1431-44.
41. Saint-Hilaire EG. Considération générale sur la vertèbre. *Mémoire du Muséum d'Histoire Naturelle* 1822; 9: 89-119.
42. De Robertis EM, Sasai Y. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 1996; 380: 37-40.
43. Muller M, Weizsäcker EV, Campos-Ortega JA. Expression domain of a zebrafish homologue of the *Drosophila* pair rule gene *hairy* correspond to primordia of alternating somites. *Development* 1996; 122: 2071-8.
44. Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowitz D, Pourquie O. Avian *hairy* gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; 91: 639-48.

## Summary

### Patterning the vertebrate and invertebrate appendages

Insect and vertebrate limbs are derived from embryonic *primordia* respectively called imaginal discs and limb buds. The final shape and size of the adult appendages depend on early patterning events which take place in those *primordia* such as the establishment of the antero-posterior, dorso-ventral and proximo-distal axis. Genetic analysis in *Drosophila* have led to the idea that axis formation is controlled by localized organizing centers, analogous to those identified by classical embryological studies in vertebrates. Significant progress has recently been made towards characterizing the cellular interactions which lead to the formation of those centers and the identification of the genes which mediate organizer function. In light of recent results, it seems that some of the fundamental mechanisms which govern insect limb patterning are also used to set up the spatial organisation of the vertebrate limbs.