Preisverleihung 1998

STIFTUNG PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Heft Nr. 26

Prof. Dr. Adriano Aguzzi
«Pathophysiologie der Prionen-Krankheiten»

Prof. Dr. Primus E. Mullis
«Short stature: from the growth hormone axis to the Development of the pituitary gland»

STIFTUNG
PROFESSOR DR. MAX CLOËTTA

Fünfundzwanzigste Preisverleihung

25. November 1998
Zürich

Heft Nr. 26 der Schriftenreihe
Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Schaffhauserstrasse 43, Postfach, 8042 Zürich
Telefon 01 350 44 35
Telefax 01 350 44 32
e-Mail cloetta@stiftung.ch

INHALT

Vorwort des Präsidenten des Stiftungsrates	5
Laudatio von Professor Dr. Charles Weissmann auf den Preisträger Professor Dr. Adriano Aguzzi	9
Urkunde für Professor Dr. Adriano Aguzzi	13
Kurzbiographie von Professor Dr. Adriano Aguzzi	15
Festvortrag von Professor Dr. Adriano Aguzzi: «Pathophysiologie der Prionen-Krankheiten»	17
Laudatio von Professor Dr. Melvin M. Grumbach, M.D. auf den Preisträger Professor Dr. Primus E. Mullis	49
Urkunde für Professor Dr. Primus E. Mullis	53
Kurzbiographie von Professor Dr. Primus E. Mullis	55
Festvortrag von Professor Dr. Primus E. Mullis: «Short stature: from the growth hormone axis to the development of the pituitary gland»	59
Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta	83
Ehrentafel der Preisträger	89

VORWORT

Professor Dr. Alex F. Muller, Präsident

Wieder ist ein Jahr vergangen, und wir haben die Ehre und Freude, Sie zur heutigen Verleihung des Cloëtta-Preises herzlich begrüssen zu dürfen. Die medizinisch-naturwissenschaftlich orientierten Forscher sind in dem Sinne bevorzugt, als die Anzahl der Preise und Auszeichnungen in diesen Wissenschaftsgebieten relativ zahlreich sind. Die Stiftung Prof. Dr. Max Cloëtta ist stolz, ihren jährlichen Beitrag leisten zu dürfen.

Unsere Stiftung hat das Privileg, noch andere Leistungen zur Förderung der medizinisch-biologischen Wissenschaften zu erbringen. Im vergangenen Jahr haben wir fünf mehrjährige Stipendien, ähnlich den SCORE- und START-Stipendien des Schweizerischen Nationalfonds, jungen Nachwuchsforscherinnen und -forschern zur Verfügung gestellt. Die Cloëtta-Stiftung leistet hiermit einen äusserst wichtigen Beitrag. Vor allem in den Zeiten der finanziellen Engpässe dürfen wir in keiner Weise das Nachwuchsproblem vernachlässigen. Hier müssen die privaten Stiftungen einspringen. Auch wenn heute die öffentliche Hand Schwierigkeiten hat, junge Kräfte zu fördern, brauchen wir morgen akademische Lehrer und Forscher. Zur Zeit unterstützt die Cloëtta-Stiftung 16 Nachwuchskandidatinnen und -kandidaten, wovon die Mehrzahl für die Dauer von fünf Jahren. Wir sind stolz, diesen Anteil an die schweizerische Forschung der Zukunft leisten zu können. Wir haben die Finanzierung der Cloëtta-Stellen für medizinische Forschung derjenigen des Nationalfonds angepasst in der Meinung, eine allgemeine schweizerische Lösung erarbeiten zu helfen. Wir hoffen, auf das Verständnis der kantonalen Universitäts-Verwaltungen und ihre Bereitschaft zu einer einwandfreien Abwicklung der finanziellen Seite zählen zu können.

Im Verlauf der letzten Jahre sind bei unserer Geschäftsstelle häufig Anträge für sogenannte Überbrückungskredite eingetroffen. Wir haben volles Verständnis für die Notwendigkeit, kurzfristig sich Geldmittel beschaffen zu müssen, sind aber der Meinung, dass allgemein gültige

Richtlinien für die Gewährung von solchen Überbrückungskrediten unerlässlich sind. Aus diesem Grunde haben wir 1997 entsprechende Grundlagen erarbeitet.
Wie schon in den vergangenen Jahren hat die Cloëtta-Stiftung ihren Anteil geleistet, um Medizinern ein Zweitstudium naturwissenschaftlicher Richtung zu ermöglichen. Gemeinsam mit dem Nationalfonds, der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften und anderen privaten Stiftungen ist es möglich, acht bis zehn frisch diplomierten Ärztinnen und Ärzten diese Ausbildung für drei Jahre zu finanzieren. Der forschungsorientierte Mediziner hat damit eine einmalige Gelegenheit, sich das Rüstzeug für eine fruchtbare Karriere anzueignen, und es ist zu hoffen, dass er den Dialog zwischen Medizin und Naturwissenschaften fördert. Wie Sie alle wissen, sind wir als Ärzte immer mehr und mehr aufgefordert, der Öffentlichkeit die bahnbrechenden Erfolge der medizinischen Grundlagenforschung verständlich zu machen. Breit ausgebildete Mediziner sind eine absolute Notwendigkeit. Das Schlagwort Genschutz-Initiative kennen Sie alle!
Das Wort 'Gen' leitet uns harmonisch über zu unseren beiden Preisträgern dieses Jahres. Der Stiftungsrat hat beschlossen, die beiden Forscher Privatdozent Dr. Gérard Waeber aus Lausanne und Professor Dr. Denis Duboule aus Genf als Preisträger der Stiftung Prof. Dr. Max Cloëtta für das Jahr 1997 zu ehren.
Dr. Gérard Waeber ist Privatdozent an der medizinischen Fakultät in Lausanne und Médecin associé am Departement für Innere Medizin. Er hat sich auf dem Gebiet der Neuropeptide und des Diabetes besonders hervorgetan.
Prof. Denis Duboule ist Professor am Departement für Zoologie und Biologie an der Universität Genf. Er vertritt mit seinen Arbeiten auf dem Gebiet der Vertebraten-Entwicklung ein charismatisches Produkt, und er gehört in Europa zu den Spitzenleuten auf seinem Gebiet.
Ich möchte nicht weiter auf die Arbeiten der beiden Preisträger eingehen, haben wir doch das Vergnügen, anschliessend unsere beiden Laudatoren anzuhören. Ich möchte Herrn Professor Pascal Nicod, Chef des Departementes für Innere Medizin in Lausanne, und Herrn Professor Walter Gehring vom Biozentrum in Basel herzlich danken. Ihre Zusage ehrt und freut uns sehr. Sie sind beide ausgezeichnete Kenner der Arbeiten unserer heutigen Preisträger. Wir erwarten mit Spannung ihre Ausführungen.

Abschliessend sei es mir gestattet, meinen Kollegen des Stiftungsrates und des medizinischen Ausschusses herzlich zu danken für ihre kostbare, effiziente und wichtige Unterstützung und Zusammenarbeit. Nur so war es möglich, den Zweck der Stiftung Prof. Dr. Max Cloëtta zu erfüllen. Einen ganz speziellen Dank verdienen die zwei Damen unseres Sekretariates, Frau Brigitt Schai, Geschäftsführerin, und Frau Irène Thomann. Sie leisten eine ausgezeichnete, unersetzliche und kompetente Arbeit. Wir schätzen diese Hilfe und Unterstützung sehr.

ELOGE DU DOCTEUR GÉRARD WAEBER

Professeur Pascal Nicod

La médecine interne a connu un essor formidable en Suisse, grâce au travail et à l'intelligence de plusieurs générations d'internistes, dont le Prof. A. Muller, que j'admire beaucoup. En 30 ans, la médecine interne a réalisé plusieurs objectifs importants:

- Elle a permis la création d'un réseau de «soins primaires» exceptionnel, hospitalier et ambulatoire, fait en grande partie d'internistes formés dans toutes les disciplines de la médecine.
- Elle a favorisé l'éclosion en son sein de toutes les spécialités d'organes et de systèmes qui ont à leur tour accéléré la révolution médicale et technologique offrant à la population des soins hautement spécialisés, exigeant des compétences médicales et techniques particulières.
- Plus que toute autre discipline, elle a gardé un lien avec les instituts de base, assurant jusqu'à récemment une continuité entre sciences de base et science clinique.

Victime de son succès, de la multiplicité des domaines qu'elle a créés, de son gigantisme, la médecine interne fait face à plusieurs menaces. La première menace est celle d'une fragmentation de la médecine interne en médecine d'organe, en oubliant que la force de notre pays est d'avoir maintenu une médecine «intégrée», et une approche globale des soins à la population. La deuxième menace est de voir se creuser encore plus un fossé entre clinique et sciences fondamentales. En effet, la complexité des sciences de base les rend difficilement accessibles aux cliniciens, qui choisissent généralement soit une carrière clinique, soit une carrière fondamentale en rejoignant un groupe hautement spécialisé.

Le risque pour la médecine interne est donc celui d'une fragmentation de l'approche clinique et d'un éloignement des sciences fondamentales. Les conséquences de cette évolution vont au-delà de la tristesse ressentie par les fervents d'une médecine intégrée. L'isolement des cliniciens peut aboutir à un appauvrissement de la recherche centrée sur la maladie et le malade, et une incompréhension mutuelle des problèmes rencontrés par les cliniciens et les scientifiques.

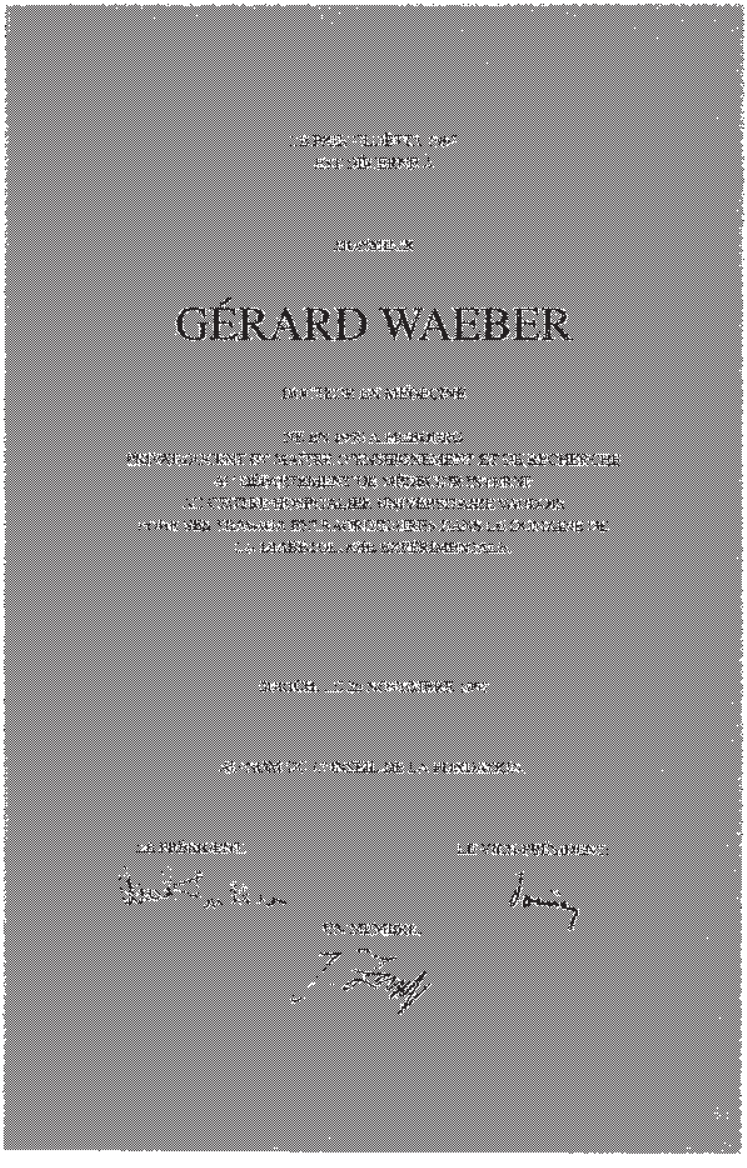
Plusieurs moyens doivent être mis en oeuvre pour éviter ces pièges de l'évolution de la médecine. Il faut maintenir des départements de médecine intégrés, multidisciplinaires. Il faut favoriser l'éclosion de réseaux de recherche interdépartementaux et d'équipes pluridisciplinaires centrés sur des projets. Enfin, il faut favoriser la formation de cliniciens-scientifiques capables d'intégrer sciences cliniques et sciences fondamentales, médecine hautement spécialisée et médecine générale.
C'est donc un très grand plaisir pour moi de présenter Gérard Waeber, qui est un des meilleurs candidats en Suisse pour maintenir une approche large de la médecine, du lit du malade au laboratoire.
Né en 1958 à Fribourg, il fait ses études au Collège St-Michel où il obtient sa maturité en 1978. Pour ses études de médecine, il vient à Lausanne où il obtient son diplôme fédéral en 1984. Il découvre les joies de la recherche sous l'impulsion des Professeurs H. Brunner et B. Waeber, son frère, qui lui transmet son grand savoir en clinique et en investigations cliniques. Après trois ans en médecine interne, il part pour Boston chez le Professeur J.F. Habener où il apprend l'endocrinologie, fondamentale et clinique. Notamment, il y acquiert une compréhension des mécanismes régulateurs de la transcription des gènes. Il obtient une bourse SCORE du Fonds National en 1992, ce qui lui permet de revenir dans de bonnes conditions à Lausanne et de commencer ses activités cliniques et fondamentales dans notre institution. En 1994, il est nommé Privat-Docent de notre faculté.
En quelques années, G. Waeber a créé un groupe de recherche enthousiaste et performant qu'il présentera lui-même, centré sur l'étude des mécanismes régulateurs de la sécrétion d'insuline dans les cellules ß du pancréas. Il montre l'influence de deux peptides sur la sécrétion d'insuline, le neuropeptide Y et le «macrophage inhibitory factor». Il décrit des mécanismes contrôlant la transcription d'un transporteur du glucose, le GLUT2, dans la cellule ß. Il caractérise un nouveau facteur transcriptionnel impliqué dans la régulation de GLUT2. Au-delà de sa recherche personnelle, il contribue à la création d'un réseau de médecins et de biologistes interdisciplinaire, centré sur l'étude du métabolisme, en exploitant les collaborations de groupes prestigieux menés par les Professeurs E. Jéquier, B. Rossier et B. Thorens.
Pendant toutes ces années, j'ai admiré ses talents de chercheur et d'organisateur d'un laboratoire efficace. Avec beaucoup de mes collègues

cliniciens, j'ai appris grâce à lui et d'autres à reconnaître l'importance de la compréhension des mécanismes fondamentaux dans la prise en charge des malades.

Mais G. Waeber m'a aussi appris des leçons en clinique. Je me souviens en particulier d'une malade hospitalisée pour des crises d'étouffements répétitifs. Le diagnostic s'orientait vers une dyspnée cardiaque ou pulmonaire, mais qui n'était pas confirmée par les tests réalisés. C'est G. Waeber, lors d'une de ses visites, qui a rappelé que des crises d'étouffement pouvaient être dues à des spasmes laryngés, dont une des causes est l'hypocalcémie. Une hypocalcémie a été ensuite mise en évidence chez notre malade et attribuée à une malabsorption sur sprue. Sa correction a guéri la malade de ses symptômes. Seule une réflexion large, basée sur la physiopathologie et sortant des chemins étroits de réflexion purement clinique a permi de trouver une solution thérapeutique.

Je compte sur Gérard Waeber et plusieurs de ses collègues pour maintenir une cohésion entre médecine générale, médecine spécialisée et sciences fondamentales, qui a fait la force de la médecine de notre pays ces dernières décennies. Une ouverture d'esprit scientifique et académique sur les problèmes cliniques est essentielle à nos institutions et permet une compréhension plus mécanistique des maladies et donc une meilleure approche thérapeutique.

Je suis reconnaissant à la Fondation du Professeur Max Cloëtta d'avoir choisi un clinicien-scientifique parmi ses lauréats, et ainsi de reconnaître l'importance de maintenir un lien intime entre sciences fondamentales et clinique.



[illegible]

[illegible]

[illegible]

GÉRARD WAEBER

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Dr Gérard Waeber

CURRICULUM VITAE

Name:	Gérard Waeber
Address:	Chemin de la Rueyre 59 1008 Jouxtens-Mézery, Switzerland
Date of Birth:	November 4, 1958
Place of Birth:	Fribourg, Switzerland
Citizenship:	Swiss, married, 2 children

Education:

1971 – 1978	Collège St-Michel, Fribourg, Switzerland
1976 – 1977	Exchange student with the American Field Service, USA
1984 M.D.	University of Lausanne School of Medicine, Switzerland
1988	Doctor in medicine, University of Lausanne School of Medicine

Postdoctoral Training:

1985 – 1986	Research and clinical fellow, University of Lausanne School of Medicine, Division of Nephrology and Hypertension (Prof. H.R. Brunner).
1986 – 1988	Clinical fellow, University of Lausanne School of Medicine, Department of Medicine (Prof. P. Burckhardt), Switzerland.
1988 – 1991	Research fellow, Molecular Endocrinology, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital (Prof. J.F. Habener), USA
1991 – 1992	Clinical fellow, Endocrine Unit, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital (Prof. H. Kronenberg/G. Daniels and Joe Avruch) Massachusetts General Hospital, Boston, USA.
1992 –	Chief Resident, Department of Internal Medicine B (Prof. P. Nicod).

Licensure and Certification:

1987	Foreign Medical Graduate Exam (ECFMG)
1996	5ème cours de formation des médecins-cadres à la gestion (IDRH/Prof. P. Delay)
1996	Titre FMH, spécialiste en Médecine Interne et Endocrinologie

Membership:

1991	Endocrine Society, USA
1993	Société Suisse d'Endocrinologie
1993	American Diabetes Association
1996	Société Suisse de Médecine Interne

Honors:

1989	Award of the University of Lausanne School of Medicine (Prix Dr. César Roux) for the thesis entitled: «Utilité de l'enregistrement ambulatoire de la pression artérielle dans la recherche, le diagnostic et le traitement de l'hypertension artérielle».
1996	Annual Award of the «Société Romande pour la recherche et le diabète».
1997	Prix Raymond Berger

Grants:

1988 – 1990	18-months grant for young investigator from the Swiss National Science Foundation.
1990 – 1991	12-months grant for advanced investigator from the Swiss National Science Foundation.
1992 – 1997	60-months Career Development Award from the Swiss National Science Foundation: SCORE A (Swiss Clinician Opting for Research. Grant No: 32-31915.91).
1992 – 1995	60-months grant from the Swiss National Science Foundation (Grant No: 32-32317.91 and 32-32317.91/2).
1994 – 1996	24-months grant from the International American Juvenile Diabetes Foundation (Grant No: 194183)

1996 – 1999	36-months grant from the Swiss National Science Foundation (Grant No: 32-49673.96)

Academic Appointments:

1988 – 1991	Research Fellow in Medicine, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, MA
1991–1992	Clinical and Research fellow in Medicine and Endocrinology, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, MA
1994 –	Privat-Docent et Maître d'Enseignement et de Recherche de la Faculté de Médecine de Lausanne. Thème de l'enseignement: «Diabétologie expérimentale».

MÉTABOLISME MOLÉCULAIRE DE LA CELLULE INSULINO-SÉCRÉTRICE

Gérard Waeber

Introduction

Le diabète est l'expression clinique la plus courante d'un désordre du métabolisme des glucides et des lipides. L'affection est de haute prévalence puisqu'elle touche approximativement 5 à 7% de la population et engendre une série de souffrances liées à une morbidité et une mortalité importante. Ce dérèglement métabolique est secondaire à une insensibilité du foie des tissus musculaires et adipeux à l'action de l'insuline et à une production inadéquate d'insuline par la cellule ß du pancréas endocrine (1-4). La cellule ß est donc une cible privilégiée à l'investigation clinique et moléculaire pour identifier les causes impliquées dans la survenue du diabète (5). Toutefois, l'identification de ces causes est un défi scientifique extraordinaire puisque cette affection a une origine mixte, génétique et liée à des facteurs de l'environnement. Notre laboratoire s'est efforcé ces dernières années de tenter de contribuer à l'identification des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'insulino-sécrétion et ainsi de mieux comprendre la pathogenèse du diabète.

Cellule ß-pancréatique: une cellule hautement spécialisée

Les îlots de Langerhans du pancréas sont composés principalement de cellules ß insulino-sécrétrices. Ces cellules intègrent de multiples informations pour assurer une insulino-sécrétion en rapport à la glycémie ambiante. Le glucose est le plus puissant inducteur de la production d'insuline et ce mécanisme nécessite un système complexe d'informations cellulaires (6). Ceci est schématiquement représenté sur la *Figure 1*. Le glucose pénètre dans la cellule ß par l'intermédiaire d'un transporteur du glucose appelé GLUT2. Cette protéine de membrane présente des caractéristiques fonctionnelles particulières, à savoir une faible affinité

pour le glucose (Kd faible) et une grande capacité de transport (Km élevé). Le glucose est par la suite métabolisé par un enzyme clé, la glucokinase, qui entraînera une succession d'événements cellulaires dont l'augmentation d'adénosine triphosphate (ATP), fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants, dépolarisation de la cellule et finalement, grâce à une mobilisation du calcium, exocytose des granules à insuline (7). Depuis de nombreuses années, la recherche clinique a démontré que la cellule ß, chez les patients diabétiques, présente une diminution de cette sensibilité au glucose (2,3,8).

L'insulino-sécrétion induite par le glucose peut être modulée par différents systèmes. Par exemple, le système nerveux autonome participe à un contrôle de l'insulino-sécrétion. Chez l'homme, il existe également une série d'hormones d'origine digestive, libérées lors de la prise alimentaire, qui participent à la potentialisation de l'insulino-sécrétion induite par le glucose. On parle d'axe entéro-insulaire pour ce système endocrinien composé principalement par deux hormones, le GIP «Gastric Inhibitory Peptide» («insulinotropic hormone») et le GLP-1 «Glucagon Like Peptide-1» (9,10).

Notre laboratoire a contribué à l'identification de nouveaux mécanismes autocrines et paracrines qui participent au contrôle de l'insulino-sécrétion. A titre d'exemple, le Neuropeptide Y (NPY) , un neurotransmetteur bien connu des neurobiologistes, a été identifié comme une molécule présente au sein même de la cellule ß et sécrétée par cette dernière (11-13). Une fois sécrétée, le Neuropeptide Y agit sur la cellule ß en inhibant la production d'insuline (14). Ce mécanisme de «feed back» négatif est important puisque la libération de Neuropeptide Y est accentuée par les hormones de l'axe entéro-insulaire et par les glucocorticoïdes (11,14,15) *(Figure 1B)*. L'importance fonctionnelle de ce mécanisme a été démontrée expérimentalement puisque l'inhibition de la production de Neuropeptide Y par la cellule ß améliore l'insulino-sécrétion (16).

Une molécule intéressante appelée MIF («Macrophage Migration Inhibitory Factor») a récemment été identifiée au sein de la cellule ß (17). Le MIF est une cytokine et une hormone libérée respectivement par les macrophages et l'hypophyse antérieure (18). Elle semble jouer un rôle critique dans le maintien de la sensibilité des tissus périphériques à l'action des glucocorticoïdes (19). Nous avons identifié MIF comme étant une molécule exprimée en grande quantité au sein de la

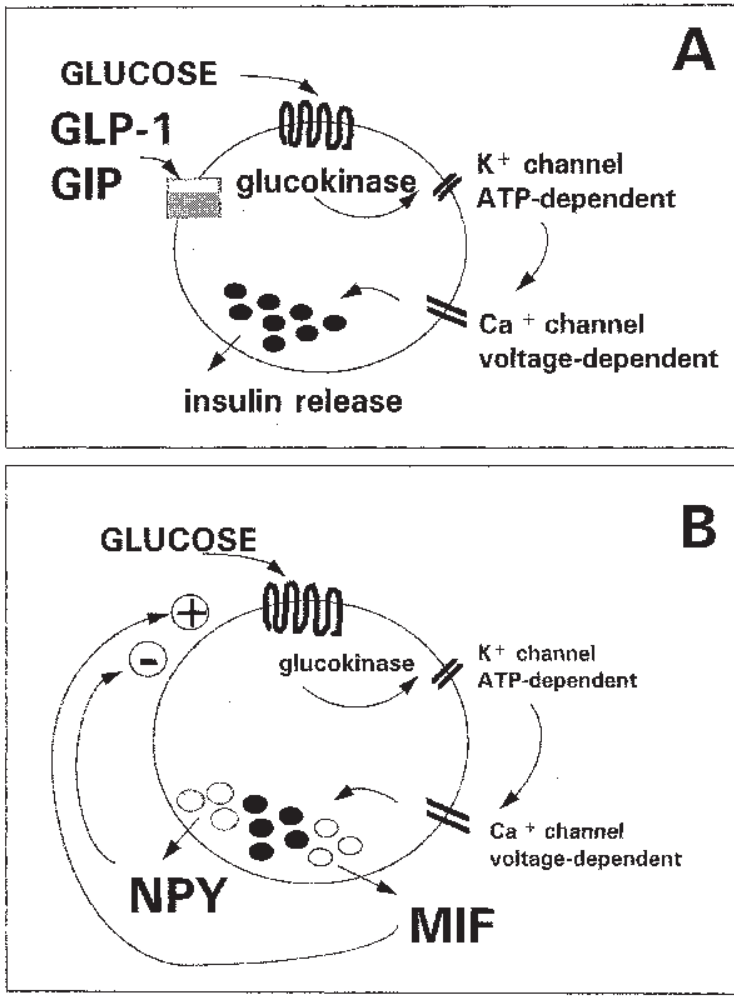


Figure 1. Cellule β-pancréatique.
Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'insulino-sécrétion induite par le glucose intègrent une série d'événements cellulaires. A) La libération d'insuline est également sous contrôle de l'axe entéro-insulaire par l'intermédiaire d'hormones tels que le GIP (Gastic Inhibitory Peptide) et GLP1 (Glucagon Like Peptide 1), du système nerveux autonome sympathique et parasympathique et B) sous l'influence de facteurs agissant par des mécanismes auto- et paracrines, comme par exemple par le MIF ou le NPY.

cellule ß, régulée de manière similaire à l'insuline et co-sécrétée avec cette hormone (17) *(Figure 1B)*. Cette molécule agit de manière autocrine en potentialisant l'insulino-sécrétion induite par le glucose. Ces observations permettent d'évoquer de nouveaux mécanismes du contrôle de l'insulino-sécrétion qui peuvent s'avérer potentiellement importants chez le patient diabétique. En effet une sensibilité réduite à l'action du MIF et/ou une production trop abondante de NPY pourraient participer à la perte de la sensibilité au glucose par le cellule ß. Ces molécules peuvent également représenter, théoriquement en tout cas, une cible privilégiée pour l'industrie pharmaceutique.

GLUT2 et diabète expérimental

La perception du glucose par la cellule ß nécessite donc la présence d'un transporteur du glucose appelé GLUT2. Plusieurs observations importantes ont évoqué le rôle important de cette protéine dans la survenue du diabète expérimental (20,21). Tous les modèles de diabète chez l'animal présentent une diminution de l'expression de cette protéine au sein de la cellule ß (20,22-26). Cette anomalie de l'expression de GLUT2 est spécifique puisque le gène est exprimé normalement dans d'autres tissus tels que le foie, le rein ou le cerveau. Chez l'animal, cette disparition est probablement responsable de la survenue du diabète. En effet, l'intégration d'une molécule antisense pour le GLUT2, au sein de la cellule ß chez des souris transgéniques induit une disparition subtotale du GLUT2 et ces animaux deviennent diabétiques (27). Plus récemment, l'équipe du Dr Bernard Thorens a réussi, par recombinaison homologue, a détruire sélectivement GLUT2 chez la souris. Ces souris sont diabétiques et le phénotype de ces animaux ressemble étrangement aux manifestations cliniques du diabète humain.

Notre groupe s'est efforcé ces dernières années de tenter d'identifier les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression ß-spécifique de GLUT2. En effet, si GLUT2 est une marqueur précoce de la survenue du diabète et si l'expression de ce gène est altérée uniquement dans la cellule ß, on peut évoquer que des facteurs transcriptionnels, à savoir des molécules qui contrôlent l'expression qualitative et quantitative des gènes, soient altérés au sein de la cellule ß. En prenant l'exemple des

souris db/db, on a observé que le mRNA codant pour GLUT2 est diminué spécifiquement au niveau de l'îlot pancréatique, alors que l'expression de l'insuline est encore normale à un stade précoce du développement du diabète. Par contre, GLUT2 mRNA est tout-à-fait conservé au niveau du foie *(Figure 2)*. Il existe donc des facteurs propres à la cellule ß responsables de cette dysrégulation de l'expression de GLUT2.

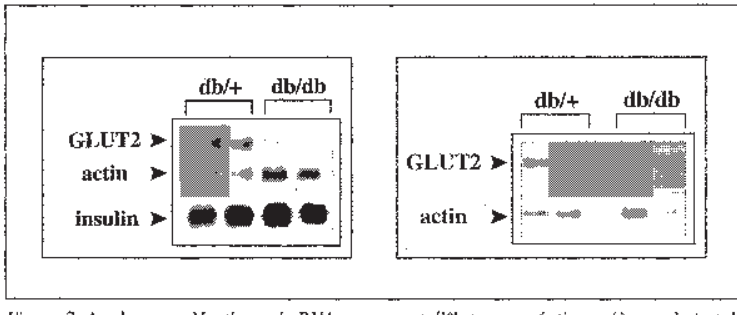
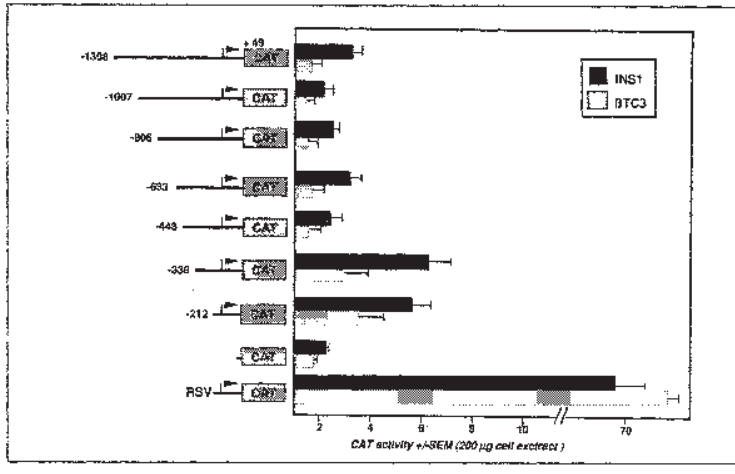


Figure 2. Analyse par Northern de RNA provenant d'îlots pancréatiques (à gauche) et de foie (à droite) de souris diabétiques (db/db) versus non diabétiques (db/+), de l'expression génique de GLUT2, de l'insuline et de l'actine.
A un stade précoce de l'évolution du diabète, l'expression génique de l'insuline est conservée alors que GLUT2 disparaît spécifiquement dans les cellules ß, mais pas dans le foie. Ceci suggère l'existence de mécanismes régulateurs propres à la cellule ß lors de diabète qui influencent précocement l'expression du gène de GLUT2.

La région promotrice de GLUT2 chez l'animal et chez l'homme a été initialement clonée et des séquences relativement conservées entre les espèces identifiées, suggérant un rôle fonctionnel important de ces régions (28). L'étude fonctionnelle de ces fragments d'ADN a été poursuivie en clonant ces promoteurs en amont d'un gène reporter puis en les transfectant dans des cellules insulino-sécrétrices. Comme démontré sur la *Figure 3A*, différents fragments du promoteur possèdent une activité transcriptionnelle de base au sein de ces cellules. En outre, un fragment de 338 bases de ce promoteur est suffisant pour conférer l'expression d'un gène reporter dans des cellules ß alors que cette expression est absente dans des cellules non apparentées (29). Pour confirmer ces données obtenues in vitro, une série de souris transgéniques ayant intégré un fragment large (1311 bases) ou plus court (338 bases) de ce pro-moteur lié à un gène reporter ont été générées (30). L'observation



la plus significative fut la détection du transgène au sein de l'îlot pancréatique démontrant dès lors que 338 bases du promoteur de GLUT2 contiennent suffisamment d'informations pour être reconnues par des facteurs transcriptionnels propres de la cellule ß-pancréatique *(Figure 3B)*.

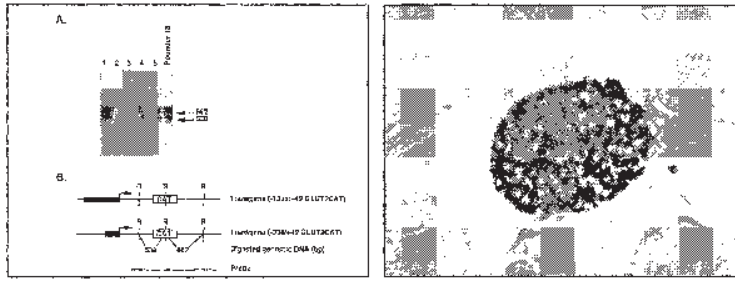


Figure 3. Activité d'un gène reporter sous contrôle de différentes constructions du promoteur de GLUT2 dans les cellules ß-pancréatiques in vitro ou in vivo dans des souris transgéniques.
A) Etude d'une série de délétions du promoteur de GLUT2 clonées en amont d'un gène reporter et transfectées dans des cellules ß. Un court fragment de 338 bases du promoteur est suffisant pour générer une activité transcriptionnelle dans les cellules ß.

B)1311 et 338 bases du promoteur murin ont été clonées en amont d'un gène reporter et utilisés pour générer une série de souris transgéniques. Le «Southern blot» démontre l'existence de transgènes intégrés et le gène reporter (CAT) est détecté au sein de l'îlot pancréatique par immunocytochimie. Ceci suggère que les informations contenues dans 338 bases du promoteur sont suffisantes pour conférer l'expression pancréatique spécifique *in vitro* et *in vivo*.

Un réseau de collaborations nous a permis d'établir que ce fragment de promoteur fonctionne également au niveau du foie où GLUT2 est exprimé. Ce promoteur est régulé par des agents contrôlant l'expression de GLUT2 endogène, à savoir le glucose et le cAMP (31,32).

Ces résultats nous ont exhortés à poursuivre la dissection des interactions protéines-DNA. Une série d'expériences comprenant des gels de

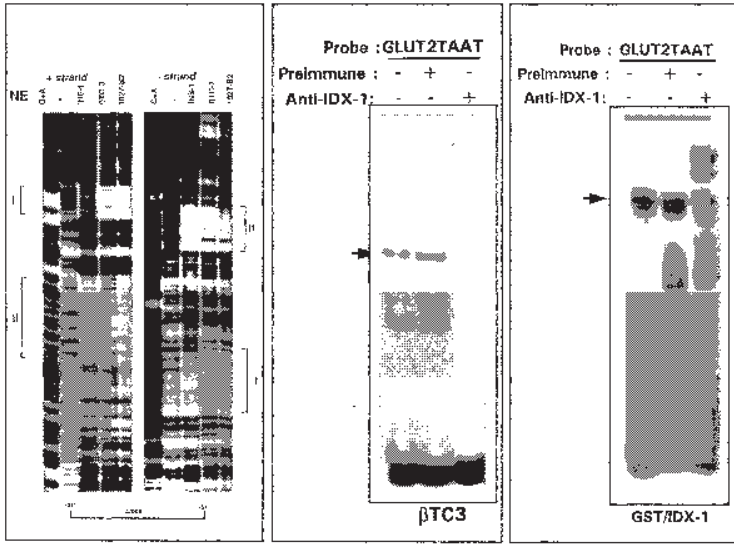


Figure 4. Interactions protéines-DNA détectées par empreinte protéique (footprint) ou par gel de retardation (band shift).
A) Le «footprint» de la région proximale du promoteur de GLUT2 démontre l'existence de deux régions protégées GTI et GTII. L'empreinte GTII est présente dans les extraits nucléaires provenant de cellules ß insulino-sécrétrices. Cette empreinte n'est pas détectée dans tout autre tissu, hormis le pancréas endocrine.
B) Exemple d'interactions «protéine-DNA» démontrées par gel de retardation. Des extraits nucléaires provenant de cellules ß (βTC3) ou d'une protéine recombinante produisant PDX-1 (GST/IDX-1) sont capables de lier spécifiquement un élément *cis* de la région promotrice de GLUT2 (GLUT2TAAT). L'adjonction d'anticorps anti-IDX-1 permet de modifier le gel de retardation (supershift), démontrant clairement que ce facteur fait partie du complexe d'interactions DNA-protéine.

retardation («band shift»), des empreintes protéiques sur le promoteur («footprint» et «Southwestern») ont été effectuées. Au sein de ces 338

bases, 3 régions principales appelées GTI, GTII et GTIII ont été identifiées (29). A titre d'exemple, la *Figure 4* illustre une empreinte protéique et un gel de retardation de cette région promotrice. Le rôle primordial que peut jouer un facteur transcriptionnel au sein d'une seule cellule peut être illustré par l'exemple de PDX-1. PDX-1 est un facteur transcriptionnel appartenant à la famille des homéobox, impliqué dans le contrôle de la différenciation du pancréas endocrine. La destruction sélective de PDX-1, par recombinaison homologue, induit la survenue d'un phénotype particulier chez l'animal puisque ces animaux ont une agénésie du pancréas (33). Chez l'homme, des mutations au sein de ce facteur sont responsables d'agénésie du pancréas dans les formes sévères et de diabète dans des formes moins sévères (34). PDX-1 gouverne donc la fonction de nombreux gènes dont GLUT2, l'insuline, la glucokinase et la somatostatine et ceci illustre bien l'importance de l'identification d'un facteur transcriptionnel comme coordinateur de la fonction globale d'une cellule (35-39).

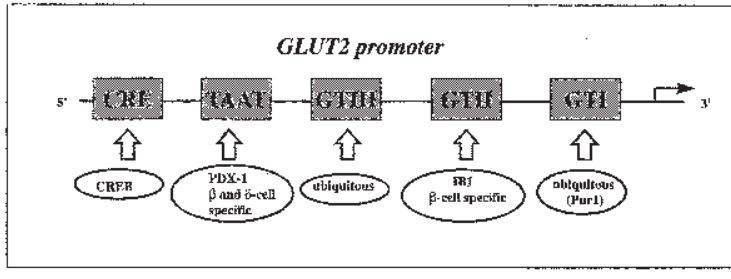


Figure 5. Résumé schématique des intéractions identifiées entres des facteurs transcriptionnels (facteurs trans) et les éléments cis du promoteur de GLUT2.

La *Figure 5* démontre schématiquement quelques éléments *cis* et *trans*, identifiés au sein du laboratoire, qui participent au contrôle de l'expression cellulaire-spécifique de GLUT2. Un élément particulier, appelé GTII s'est avéré être le plus intéressant. GTII est un élément *cis* de la région proximale du promoteur de GLUT2 qui lie des protéines exprimées uniquement au sein de l'îlot pancréatique. De plus, ces protéines sont d'autant plus abondantes que l'expression génique de GLUT2 est importante. Un effort fut entrepris pour cloner ces facteurs. Plusieurs bibliothèques ont été créées en utilisant du mRNA provenant

de cellules ß animales ou humaines. Ces bibliothèques ont été criblées à l'aide d'une sonde GTII. Il s'agit d'un clonage dit d'expression puisque l'identification d'un cDNA est obtenu sur la base d'une intéraction

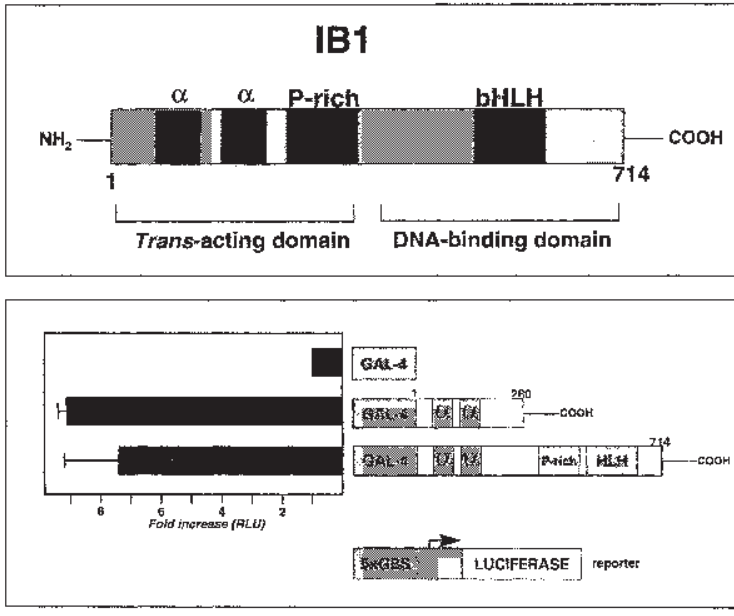


Figure 6. Structure d'IBI et fonctions de transactivation de cette protéine.
A) IBI est une protéine de 714 acides aminés et les régions de transactivation et de liaison au DNA sont décrites schématiquement.
B) La partie amino-terminale d'IB1 contient le domaine de transactivation du facteur de transcription. La fusion de cette région à un domaine de liaison hétérologue GAL4 confère une forte activité de transactivation.

protéine-DNA (40). De cette manière fut isolé un facteur transcriptionnel appelé IB1 («Islet-Brain 1») dont l'expression est la plus abondante au niveau de l'îlot pancréatique et du cerveau. Ce gène, inconnu des banques de données, code pour une protéine de 714 acides aminés, schématiquement représentée sur la *Figure 6*. Il s'agit d'un facteur transcriptionnel dont l'expression tissulaire très restrictive lui attribue un rôle fonctionnel particulier. En effet, IB1 est très abondant au niveau de la cellule ß, mais absent au niveau du foie où GLUT2 est également

exprimé. En se rappelant que le diabète induit une disparition de GLUT2 uniquement au niveau de la cellule ß mais pas au niveau du foie et du rein, une dysrégulation d'IB1 pourrait être responsable de la disparition de GLUT2 et de la survenue du diabète. IB1 fonctionne comme transactivateur du gène de GLUT2 et de l'insuline et cette fonction analogue à PDX-1 permet de suggérer qu'IB1 pourrait être un régulateur plus général de la fonction de la cellule ß (41).

L'identification de ce premier gène chez le rat nous a permis d'identifier le gène murin, puis humain. Les séquences sont très conservées entre ces différentes espèces et l'identification humaine a permis de localiser ce gène au niveau du chromosome 11p11. Ceci ouvre un nouveau champ d'investigations génétiques. Un réseau de collaborations internationales comprenant, entre autres, l'équipe du Prof. Philippe Froguel de l'Institut Pasteur de Lille a débuté depuis peu. Cet investigateur avait identifié plusieurs gènes impliqués dans la survenue de formes particulières du diabète appelé MODY (42,43). C'est dans cette quête de gènes candidats que l'équipe du Prof. Froguel avait identifié une série de familles souffrant d'un diabète lie à une anomolie génique localisée sur le chromosome 11p. Des investigations génétiques sont en cours pour confirmer ou infirmer le rôle que pourrait jouer IB1 dans la survenue du diabète dans ces familles.

Conclusion et perspectives

La dissection des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de l'insulino-sécrétion reste un réel défi scientifique. C'est un effort à poursuivre puisque l'identification de ces mécanismes et des gènes impliqués dans ce contrôle de l'insulino-sécrétion devrait permettre d'améliorer le diagnostic, la prévention et la recherche pharmacologique des années à venir. A titre d'exemple, on peut évoquer des formes particulières de diabète appelées MODY. Les MODYs sont des formes de diabète à transmission autosomale dominante dont quelques gènes ont été identifiés récemment. L'évolution clinique est ainsi différente chez un patient diabétique porteur d'une mutation du gène codant pour la glucokinase (MODY II) comparé à un patient diabétique porteur

d'une mutation au sein du gène codant pour le facteur transcriptionnel α-HNF I (MODY III) (42-44). Cela signifie que le diagnostic et le pronostic, et donc la prise en charge thérapeutique de ces diabètes sont étroitement liés aux facteurs étiopathogéniques, à savoir aux gènes incriminés. Un effort considérable devra être entrepris ces prochaines années pour tenter de réunir les compétences des chercheurs cliniciens et fondamentalistes pour tenter de mieux prévenir la survenue d'un diabète et de mieux soigner cette affection.

Remerciements:

L'ensemble de ce travail n'aurait jamais pu exister sans le soutien merveilleux de mon épouse Anne-Christine et de mes enfants Sabine et Karen, sans l'aide et les encouragements de mes parents, beaux-parents et belle-famille. Mes plus vifs remerciements sont aussi adressés à mon frère Bernard qui fut pour moi non seulement un exemple d'investigateur clinique hors pair, mais également un mentor durant toutes ces années de formation post-graduée. Ce travail n'aurait également pas pu exister sans l'aide précieuse et le dévouement de tous mes collaborateurs à savoir le Dr Christophe Bonny, Madame Nancy Thompson, Mademoiselle Myriam Steinmann, le Dr Jacques-Antoine Haefliger, le Dr Vincent Mooser, le Dr Olivier Bonny, Mademoiselle Anne Maillard et le Dr Jean-Baptiste Pellet.

Les Professeurs Hans R. Brunner, Joël F. Habener et Pascal Nicod ont tous énormément influencé ma carrière tant par l'exemple de leur travail respectif que par leurs conseils si précieux. Je leur en suis très reconnaissant. En dernier lieu, je ne saurais oublier le soutien financier du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique, l'aide de diverses fondations dont l'«International Juvenile Diabetes Foundation», la Fondation Romande pour la Recherche sur le Diabète et la Fondation Placide Nicod qui ont tous généreusement contribué à ma formation et à toutes les activités issues de mon laboratoire. Finalement, je souhaite inclure dans mes remerciements notre dévouée secrétaire, Madame Marie-Agnès Blanc.

REFERENCES

1. DeFronzo, R. A. 1988. The triumvirate: beta cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. Diabetes 37:667-687.

2. Mitrakou, A., D. Kelley, M. Mokan, T. Veneman, T. Pangburn, J. Reilly, and J. Gerich. 1992. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. Engl J Med 326:22-29.

3. Dinneen, S., J. Gerich, and R. Rizza. 1992. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 327:707-713.

4. Polonsky, K. S., J. Sturis, and G. I. Bell. 1996. Non-Insulin-Dependent Diabetes mellitus: a genetically programmed failure of beta cell to compensate for insulin resistance. N Engl J Med 334:777-783.

5. Leahy, J. L. and A. E. Boyd. 1993. Diabetes genes in non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 328:56-57.

6. Meglasson, M. D. and F. M. Matschinsky. 1986. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. Diab Met Rev 2:163-214.

7. Wollheim, C. B. and G. W. G. Sharp. 1981. Regulation of insulin release by calcium. Physiol Rev 61:914-973.

8. Ward, W. K., D. C. Bolgiano, B. McKnight, J. B. Halter, and D. J. Porte. 1984. Diminished B-cell secretory capacity in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 74:1318-1328.

9. Thorens, B. and G. Waeber. 1993. Glucagon-like peptide-1 in the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. Diabetes 42:1219-1225.

10. Unger, R. H. and A. M. Eisentraut. 1969. Entero-insular axis. Arch Intern Med. 123:261-266.

11. Waeber, G., N. Thompson, B. Waeber, H.-R. Brunner, P. Nicod, and E. Grouzmann. 1993. Neuropeptide Y expression and regulation in a differentiated rat insulin-secreting cell line. Endocrinology 133:1061-1067.

12. Waeber, G., J. Hurlimann, P. Nicod, and E. Grouzmann. 1995. Immunolocalization of neuropeptide Y in human pancreatic endocrine tumors. Peptides 16:921-926.

13. Waeber, G., J. Hurlimann, J.-A. Haefliger, F. Gomez, P. Nicod, and E. Grouzmann. 1996. Neuropeptide Y secretion from a human insulinoma. J Endocrinol Invest 19:190-195.

14. Myrsen-Axcrona, U., S. Karlsson, F. Sundler, and B. Ahren. 1997. Dexamethasone induces neuropeptide Y (NPY) expression and impairs insulin release in the insulin-producing cell line RINm5F. J Biol Chem 272:10790-10796.

15. Myrsen, U., B. Ahren, and F. Sundler. 1996. Dexamethasone-induced neuropeptide Y expression in rat islet endocrine cells. Diabetes 45:1306-1316.

16. Wang, Z.-L., W. M. Bennet, R.-M. Wang, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1994. Evidence of a paracrine role of neuropeptide Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. Endocrinology 135:200-206.

17. Waeber, G., T. Calandra, R. Roduit, J.-A. Haefliger, C. Bonny, N. Thompson, B. Thorens, E. Temler, A. Meinhardt, M. Bacher, C. N. Metz, P. Nicod, and R. Bucala. 1997. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet β cell macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci USA 94:4782-4787.

18. Bernhagen, J., T. Calandra, R. A. Mitchell, S. B. Martin, K. J. Tracey, W. Voelter, K. R. Manogue, A. Cerami, and R. Bucala. 1993. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. Nature 365:756-759.

19. Calandra, T., J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami, and R. Bucala. 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. Nature 377:68-71.

20. Orci, L., M. Ravazzola, D. Baetens, L. Inman, M. Amherdt, R. G. Peterson, C. B. Newgard, J. H. Johnson, and R. H. Unger. 1990. Evidence that down-regulation of B-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. Proc Natl Acad Sci USA 87:9953-9957.

21. Unger, R. H. 1991. Diabetic hyperglycemialink to impaired high Km glucose transport in pancreatic ß-cells. Science 251:1200-1205.

22. Johnson, J. H., A. Ogawa, L. Chen, L. Orci, C. B. Newgard, T. Alam, and R. H. Unger. 1990. Underexpression of ß-cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. Science 250:546-548.

23. Ohneda, M., J. H. Johnson, L. R. Inman, L. Chen, K. I. Suzuki, Y. Goto, T. Alam, M. Ravazzola, L. Orci, and R. H. Unger. 1993. GLUT2 expression and function in ß-cells of GK rats with NIDDM. Diabetes 42:1065-1072.

24. Orci, L., R. H. Unger, M. Ravazzola, A. Ogawa, I. Komiyia, D. Baetens, H. F. Lodish, and B. Thorens. 1990. Reduced B-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. J Clin Invest 86:1615-1622.

25. Thorens, B., Y.-J. Wu, J. L. Leahy, and G. C. Weir. 1992. The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive B cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. J Clin Invest 90:77-85.

26. Thorens, B., G. C. Weir, J. L. Leahy, H. F. Lodish, and S. Bonner-Weir. 1990. Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6492-6496.

27. Valera, A., G. Solanes, J. Fernandez-Alvarez, A. Pujol, J. Ferrer, G. Asins, R. Gomis, and F. Bosch. 1994. Expression of Glut-2 antisense RNA in β cells of transgenic mice leads to diabetes. J. Biol. Chem. 269:28543-28546.

28. Waeber, G., N. Thompson, J.-A. Haefliger, and P. Nicod. 1994. Characterization of the murine high Km glucose transporter GLUT2 gene and its transcriptional regulation by glucose in a differentiated insulin-secreting cell line. J Biol Chem 269:26912-26919.

29. Bonny, C., N. Thompson, P. Nicod, and G. Waeber. 1995. Pancreatic-specific expression of the glucose transporter type 2 gene: identification of cis-elements and islet-specific trans-acting factors. Mol Endo 9:1413-1426.

30. Waeber, G., T. Pedrazzini, O. Bonny, C. Bonny, M. Steinmann, P. Nicod, and J.-A. Haefliger. 1995. A 338 bp proximal fragment of the glucose transporter type 2 (GLUT2) promoter drives reporter gene expression in the pancreatic islets of transgenic mice. Mol Cell Endocrinol 114:205-215.

31. Rencurel, F., G. Waeber, B. Antoine, P. Rocchiccioli, P. Maulard, and J. Girard. 1996. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. Biochem J 314:903-909.

32. Rencurel, F., G. Waeber, C. Bonny, B. Antoine, P. Maulard, J. Girard, and A. Leturque. 1997. Cyclic adenosine monophosphate prevents the glucose-mediated stimulation of GLUT2 gene transcription in hepatocytes. Biochem J 322:441-448.

33. Jonsson, J., L. Carlsson, T. Edlund, and E. Edlund. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature 371:606-609.

34. Stoffers, D., N. T. Zinkin, V. Stanojevic, W. L. Clarke, and J. F. Habener. 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. Nature Genetics 15:106-110.

35. Leonard, J., B. Peers, T. Johnson, K. Ferreri, S. Lee, and M. R. Montminy. 1993. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. Mol Endo 7:1275-1283.

36. Miller, C. P., R. E. McGehee, Jr, and J. F. Habener. 1994. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. EMBO J 13:1145-1156.

37. Ohlsson, H., K. Karlsson, and T. Edlund. 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. EMBO J 12:4251-4259.

38. Waeber, G., N. Thompson, P. Nicod, and C. Bonny. 1996. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. Mol Endo 10:1327-1334.

39. Watada, H., Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. A. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, and Y. Yamasaki. 1996. The human glucokinase gene beta-cell promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. Diabetes 45:1478-1488.

40. Singh, H., J. H. LeBowitz, A. S. Baldwin, and P. A. Sharp. 1988. Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. Cell 52:415-423.

41. Bonny, C., P. Nicod, and G. Waeber. 1997. Expression cloning of a novel transcriptional activator which participates in the ß-cell specific control of the GLUT2 gene. Submitted.

42. Vionnet, N., M. Stoffel, J. Takeda, K. Yasuda, G. I. Bell, H. Zouali, S. Lesage, G. Velho, F. Iris, P. Passa, P. Froguel, and D. Cohen. 1992. Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non insulin dependent diabetes mellitus. Nature 356:721-722.

43. Yamagata, K., N. Oda, P. J. Kaisaki, S. Menzel, H. Furuta, M. Vaxillaire, L. Southam, R. D. Cox, G. M. Lathrop, V. V. Boriraj, X. Chen, N. J. Cox, Y. Oda, H. Yano, M. M. LeBeau, S. Yamada, H. Nishigori, J. Takeda, S. S. Fajans, A. T. Hattersley, N. Iwasaki, T. Hansen, O. Pedersen, K. S. Polonsky, R. C. Turner, G. Velho, J.-C. Chèvre, P. Froguel, and G. I. Bell. 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384:455-458.

44. Froguel, P., M. Vaxillaire, and G. Velho. 1997. Genetic and metabolic heterogeneity of maturity-onset diabetes of the young. Diabetes Metab Rev 5:123-130.

PUBLICATIONS

1. Waeber G., Waeber B., Nussberger J., Brunner H.R. Ambulatory blood pressure monitoring in adolescent untreated hypertensive patients. Clin Exp Hyper. 1986; A8:611-614.

2. Biollaz J., Waeber G., Jaggi C., Waeber B., Nussberger J., Brunner H.R. Effets de la perfusion de facteurs natriurétiques auriculaires synthetiques sur quelques flux regionaux chez le volontaire sain. Arch Maladies Cœur. 1986; 79:961-966.

3. Bidiville J., Waeber G, Nussberger J., Biollaz J., Porchet M., Waeber B., Brunner H.R. Effects d'une perfusion d'un facteur natriurétique auriculaire humain chez des volontaires sains. Schweiz. Med. Wschr. 1986; 116:1733-1735.

4. Waeber B., Waeber G., Nussberger J., Brunner H.R. L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine comme approche therapeutique: le pour et le contre. Revue Medicale de Bruxelles 1986; 7:227-230.

5. Waeber G., Fasanella d'Amore T., Nussberger J., Waeber B., Brunner H.R. Repeated doses of the converting enzyme inhibitor CGS 14824A: Effect on blood pressure and the renin-angiotensin system. Eur J Clin Pharmacol 1987; 31:643-646.

6. Nussberger J., Waeber G., Bidiville J., Waeber B., Brunner H.R. Pharmacodynamic and humoral effects of single intravenous doses of captopril in normal subjects. Clin. Exp. Hypertension 1987; A9:345-350.

7. Brunner H.R., Nussberger J., Bidiville J., Waeber G., Porchet M., Waeber B. Acute antihypertensive effect of angiotensin converting enzyme inhibition and calcium entry blockade. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1987; 10:87-89.

8. Brunner H.R, Bidiville J., Waeber G., Porchet M., Nussberger J., Waeber B. Angiotensin converting enzyme inhibitor versus calcium antagonist in the treatment of hypertension. Nephron 1987; 47:87-89.

9. Mooser V., Waeber B., Bidiville J., Waeber G., Nussberger J., Brunner H.R. Kalemia during combined treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor and a potassium-sparing diuretic. J. Clin. Hypertension 1987; 3:510-513.

10. Le Quan Sang KH., Waeber G., Pernollet MG., Nussberger J., Devynck MA., Waeber B., Brunner H.R., Meyer P. Atrial Natriuretic peptide and in vivo cell Na+ and Ca2+ handling. In Biologically Active Atrial Peptides, vol 1: American Society of Hypertension Symposium Series, BM. Brenner and JH. Laragh, eds., Raven Press, New York, 1987; pp 363-366.

11. Brunner H.R., Bidiville J., Waeber G., Porchet M., Nussberger J., Waeber B. Angiotensinconverting-enzyme-hemmer im Vergleich zu Kalziumantagonisten bei der Behandlung von Hypertonie. In: Enalapril in der Behandlung der Hypertonie, H.R. Brunner and K. Lehmann, Eds, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987, pp. 65-68.

12. Waeber B., Scherrer U., Petrillo A., Bidiville J., Nussberger J., Waeber G., Hofstetter JR., Brunner H.R. Are some hypertensive patients overtreated? Results of a prospective study of ambulatory blood pressure recordings. Lancet 1987; ii:732-734.

13. Bidiville J., Waeber G., Nussberger J., Biollaz J., Porchet M., Waeber B., Brunner H.R. Hemodynamic, renal and endocrine effects of 4-hour infusions of human atrial natriuretic peptide in normal volunteers. Fund. Clin. Pharmacol. 1988; 2:413-429.

14. Waeber G., Beck G., Waeber B., Bidiville J., Nussberger J., Brunner H.R. Comparison of betaxolol with verapamil in hypertensive patients: discrepancy between office and ambulatory blood pressures. J. Hypertension 1988; 6:239-245.

15. Bidiville J., Nussberger J., Waeber G., Porchet M., Waeber B., Brunner H.R. Are good antihypertensive responses to converting enzyme inhibitor or calcium antagonists mutually exclusive? Hypertension 1988; 11:166-173.

16. Waeber G., Schapira M., Waeber B., Aubert J.F., Nussberger J., Brunner H.R. Hypotensive effect of the active fragment derived from factor XII is mediated by an activation of the plasma kallikrein-kinin system. Circ. Shock 1988; 26:375-382.

17. Nussberger J., Waeber G., Waeber B., Bidiville J., Brunner H.R.: Plasma angiotensin (1-8) octapeptide measurement to assess acute angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril administered parenterally to normal subjects. J. Cardovasc. Parmacol. ii:716-721, 1988.

18. Waeber G., Burnier M., Porchet M., Nussberger J., Waeber B., Brunner H.R. Effects of prolonged administration of an angiotensin converting enzyme inhibitor CGS 16617 in normotensive volunteers. Eur. J. Clin Pharmacol. 1989; 36:587-591.

19. Habener J.F., Hoeffler JP., Jameson J.L., Meyer TE., Waeber G., Yun Y. Transcription factors that activate cAMP-responsive expression of the gonadotropin alpha subunit gene. In: Structure-Function Relationship of Gonadotropin. Raven Press, New York, D. Bellet and JM. Bidart, eds, Serono Symp. Publ., 65:165-176, 1989.

20. Habener J.F., Meyer TE., Yun Y., Waeber G., Hoeffler JP. Characterization of the cAMP-regulated enhancer-binding protein. Metabolism, 39 (9) 1990:13-16.

21. Hoeffler JP., Meyer TE., Waeber G., Habener J.F. Multiple cyclic AMP response element DNA binding proteins generated by gene diversification and alternative exon splicing. Molecular Endocrinology, 4:920-930, 1990.

22. Waeber G., Meyer TE., Hoeffler JP., Habener J.F. Diversification of cyclic AMP-responsive enhancer binding proteins generated by alternative exon splicing. Trans Assoc Amer Phys 103:28-37, 1990.

23. Hoeffler JP., Meyer TE., Waeber G., Yun Y., Jameson J.L., Habener J.F. Modulation of glycoprotein hormone alpha gene transcription by a cyclic AMP-responsive DNA binding protein. In: Chin WW and Boime IS, eds, Glycoprotein hormones: structure, synthesis and biologic function. Plenum Publishing Corporation. New York, NY, 1990; 279-290.

24. Waeber G., Meyer T.E., Lesieur M., Hermann H.L., Gérard N., Habener J.F. Developmental stage-specific expression of the cyclic AMP response element binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing. Molecular Endo: 10, 1419-1430, 1991.

25. Waeber G. and J.F. Habener. Nuclear translocation and DNA recognition signals colocalized within the bZIP domain of cyclic AMP response element binding protein CREB. Molecular Endo: 10, 1431-1438, 1991.

26. Waeber G., Habener J.F. Novel testis germ cell-specific transcript of the CREB gene contains an alternatively spliced exon with multiple in-fram stop codons. Endocrinology 131, No4:2010-2015, 1992.

27. Waeber G. Hirsutisme: que faire? Revue Suisse de Médecine PRAXIS, 81. 16:511-518, 1992.

28. Waeber G. and Nicod P. Quelques mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse du diabète de type II et leur importance thérapeutique potentielle. Schweiz. Med. Wschr. 1992; 122:1109-1116.

29. Meyer T.E., Waeber G., Beckman W., Lin J., Habener J.F. The promoter of the gene encoding 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding protein contains cAMP response elements: evidence for positive autoregulation of gene transcription. Endocrinology, 132, 2:770-780, 1993.

30. Waeber G., Pralong G., Breitenstein E., Nicod P. Laryngospasme: présentation inhabituelle d'une maladie coeliaque. Schweiz. Med. Wschr. 1993; 123:432-434.

31. Waeber G., J.R. Ross, E. Gilpin, P. Nicod. Utilization of coronary angiography after myocardial infarction. Primary Cardiology, 1993; 19:33-45.

32. Waeber G. Dysfonction de la cellule ß-pancréatique observée lors d'un diabète non insulino-dépendant. Revue Médicale de Suisse Romande, 1993; 113:695-698.

33. Waeber G., Thompson N., Waeber B., Brunner H.R., Nicod P., Grouzmann E. Expression and regulation of Neuropeptide Y in a highly differentiated rat insulinoma cell line. Endocrinology 1993, 133:1061-1067.

34. Thorens B. and Waeber G. Glucagon-like peptide-1 in the control of insulin-secretion in the normal state and in NIDDM. Diabetes, 1993; 42:1219-1225.

35. Waeber G., Thompson N., Haefliger J.-A., Nicod P. Characterization of the murine high Km glucose transporter GLUT2 gene and its transcriptional regulation by glucose in a differentiated insulin-secreting cell. J. Biol. Chem., 1994; 43:26912-26919.

36. Grouzmann E., Werffeli-George, Fathi M., Burnier M., Waeber B., Waeber G. Angiotensin II mediates norepinephrine and neuropeptide Y release in human pheochromocytoma cells J. Clin. Endocrinology and Metabolism. 1994; 79:1852-56.

37. Burnier M., Centeno G., Waeber G., Centeno C., Burki E. Effect of endotoxin on the angiotensin II receptor in cultured vascular smooth muscle cells. British J. Pharmacol., 1995; 116:2524-2530.

38. Waeber G., Pedrazzini T., Bonny O., Bonny C., Nicod P., Haefliger J.-A. A 338 bp fragment of the glucose transporter type 2 (GLUT2) promoter drives reporter gene expression in the pancreatic islet in transgenic mice. Molecular and Cellular Endocrinology, 114:205-215, 1995.

39. Bonny C., Thompson N., Nicod P., Waeber G. Pancreatic-specific expression of the glucose transporter type 2 (GLUT2) gene: identification of *cis*-elements and islet-specific *trans*-acting factors. Molecular Endocrinology, 1995; 1413-1426.

40. Waeber G. Comportements de la cellule ß pancréatique lors de diabète de type I ou II: implications cliniques? Revue Médicale de la Suisse Romande, 1995; 115:627-634.

41. Waeber G., Bonny O., Nicod P. Hypoglycémie: approche diagnostique. Schweizerische Rundschau für Medizin, PRAXIS, 84:1000-1004, 1995.

42. Waeber G., Hurlimann E., Nicod P., Grouzmann E. Immunolocalization of Neuropeptide Y in human pancreatic endocrine tumors. Peptides, 1995; 16:921-926.

43. Haefliger J.-A., Bergonzelli G., Waeber G., Aubert J.-F., Gavras H., Nicod P., Waeber B. Renin and angiotensin II receptor gene expression in kidneys of renal hypertensive rats. Hypertension, 1995; 26:733-737.

44. Waeber G., Hurlimann E., Haefliger J.-A., Gomez F., Nicod P., Grouzmann E. Neuropeptide Y secretion from a human insulinoma. J. Endocrinol Invest, 1996; 19:190-195.

45. F. Rencurel, Waeber G., Antoine B., Maulard P., Girard J., Leturque A. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. Biochem. J. 1996; 314:903-909.

46. Waeber G., N. Thompson, P. Nicod, C. Bonny. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IDX-1/STF-1/IPF-1 homeobox factor. Molecular Endocrinology, 10:1327-1334, 1996.

47. Waeber G., T. Calandra, R. Roduit, C. Bonny, J.-A. Haefliger, N. Thompson, B. Thorens, E. Temler, A. Meinhardt, M. Bacher, C. Metz, P. Nicod, R. Bucala. Insulin secretion regulated by the glucose-dependent production of islet ß-cell MIF. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94:4782-4787.

48. Waeber G., F. Gomez, Bishof-Delaloye, D. Chautard, M.-A. Francke, J.-A. Haefliger, E. Centeno, U. Scherrer, E. Temler, P. Nicod. Insulinoma asociated with a patient with MEN1: functional somatostatin receptors and abnormal glucose-induced insulin secretion. Horm. Research, 1997; 48:76-82.

49. J.-A. Haefliger, E. Castillo, G. Waeber, G. Bergonzelli, J.-A. Aubert, E. Suter, P. Nicod, B. Waeber, P. Meda. Experimental hypertension increases connexin 43 expression in a tissue-specific manner Circulation, 1997; 95:1007-1014.

50. Waeber G. et J.-A. Haefliger. La biologie moléculaire est-elle utile au praticien? Schweiz Med. Wschr., 1997; 127:554-560.

51. G. Waeber, F. Gomez, P. Chaubert, E. Temler, G. Chapuis, O. Boulat, P. Nicod, J.-A. Haefliger. In vivo and in vitro effects of somatostatin and insulin on glucagon release in a human glucagonoma. 1997, Clinical Endocrinology. 46:637-642.

52. F. Rencurel, G. Waeber, C. Bonny, B. Antoine, P. Maulard, J. Girard, A. Leturque. Cyclic adenosine monophosphate prevents the glucose-mediated stimulation of GLUT2 gene transcription in hepatocytes. Biochemical J., 1997; 332:441-448.

53. P. Jornod, M. Vannotti, D.R. Dascal, C. Auer, M. Berode, H. Savolainen, T. Buclin, P. Nicod, G. Waeber. Intoxication volontaire au mercure: conséquences biologiques et signification psychiatrique. PRAXIS, 1997; 86:946-951.

54. Thorens B. et Waeber G. GLUT2 function, expression and transcriptional regulation in liver and ß pancreatic cells. Facilitative Glucose Transporters, Molecular Biology Intelligence Unit, RG Landes and Co., 1997, chapter 6:167-182.

55. C. Bonny, R. Roduit, B. Thorens, P. Nicod, G. Waeber. The loss of GLUT2 expression in the ß-cells of diabetic db/db mice is associated with an impaired DNA-binding affinity of islet-specific *trans*-acting factors. Submitted, 1997.

56. C. Bonny, P. Nicod, G. Waeber. Expression cloning of a novel transcriptional activator which participates in the ß-cell specific control of the GLUT2. Submitted, 1997.

57. J.-A. Haefliger, B. Waeber, E. Castillo, J.F. Aubert, J. Nussberger, P. Nicod, G. Waeber. Neuropeptide Y and renin gene expression in kidneys of hypertensive rats. Submitted, 1997.

58. S. Gremlich, C. Bonny, G. Waeber, B. Thorens. Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. In press, J. Biol. Chem.

59. G. Waeber, N. Thompson, M. Steinmann, P. Nicod, T. Chautard, F. Pralong, T. Calandra, R.C. Gaillard. Transcriptional activation of the Macrophage Migration Inhibitory Factor gene by CRF is mediated by the cAMP Responsive element binding protein CREB in pituitary cells. Submitted 1997.

LAUDATIO AUF PROFESSOR DENIS DUBOULE

Prof. Dr. Walter Gehring

Der Tag, an dem ich Denis Duboule erstmals begegnete, ist mir in lebhafter Erinnerung geblieben. Er kam ins Biozentrum und besuchte mich in meinem kleinen, mit Büchern und Zeitschriften völlig überladenen Büro, dessen Wände mit Bildern von Fliegen mit Beinen am Kopf und ähnlichem dekoriert sind. Die Fliege mit Beinen am Kopf, die Mutante Antennapedia, hatte uns zur Entdeckung der Homeobox geführt, einem kleinen DNA-Segment, das den Schlüssel zum Verständnis der Gene lieferte, die den Bauplan der Taufliege bestimmen. Die Homeobox war es denn auch, die den Grund seines Besuches darstellte. Denis Duboule hatte gerade seine Dissertation in Genf abgeschlossen und war unterwegs nach Strassburg. Er wollte dort mit einem Stipendium der European Molecular Biology Organization (EMBO) bei Pierre Chambon als Postdoctoral Fellow über RNA-Transkription arbeiten, um sich das nötige Rüstzeug in Biochemie und Molekularbiologie zu erwerben. Sein eigentliches Interesse lag allerdings auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie. In Zusammenarbeit mit Eddy De Robertis hatten wir das erste Homeobox-Gen von einem Wirbeltier, dem Krallenfrosch Xenopus, isoliert, und das eröffnete die Möglichkeit, dass auch der Bauplan der Wirbeltiere, trotz aller Unterschiede zu den Insekten, durch homeotische Gene bestimmt sein könnte. Dieser kühne Gedanke wurde von Denis Duboule sofort aufgenommen. Er wollte die Homeoboxgene der Maus und des Huhns isolieren und kam nach Basel, um sich die Drosophila-Sonden zu holen. Er schrieb nicht einfach einen Brief, wie dies die meisten andern Kollegen taten; er kam auf Besuch, um die Projekte mit mir zu besprechen. Es war der Beginn einer langandauernden Freundschaft.

Der Krallenfrosch ist zwar für embryologische und molekulare Studien gut geeignet, idealer aber für genetische Untersuchungen ist die Maus. Der Mausembryo hat jedoch auch einen Nachteil, er pflanzt sich nämlich im mütterlichen Uterus ein, so dass die frühen Embryonalstadien nur schwer zugänglich sind. Diese Schwierigkeit kann durch Untersuchungen am Hühnerembryo überwunden werden, bei dem auch die frühen Stadien

zugänglich sind. Bei Denis Duboule fielen die Homeobox-Sonden auf fruchtbaren Boden. Er isolierte eine ganze Reihe von Homeoboxgenen und zeigte, dass sie nicht nur in ihrer DNA-Sequenz sehr ähnlich zu denjenigen von Drosophila sind, sie sind auch gruppiert und in der gleichen Reihenfolge auf dem Chromosom angeordnet, wie bei Drosophila. Die Expression entlang der Körperachse entspricht genau ihrer Anordnung entlang dem Chromosom: Die Gene, welche die Kopfsegmente spezifizieren, liegen am einen Ende der Gengruppe, die thorakalen in der Mitte und die Schwanzgene am anderen Ende. Denis Duboule hat nicht nur diese Kolinearität zwischen der chromosomalen Anordnung und der räumlichen Genexpression nachgewiesen, sondern auch eine zeitliche Kolinearität aufgezeigt; die Kopfgene werden zuerst exprimiert und die hinteren Gene sukzessive später. Die funktionelle Bedeutung dieser Anordnung der Homeoboxgene ist noch unklar, aber Denis Duboule und seine Mitarbeiter haben in sehr eleganten Experimenten gezeigt, dass die Position des Gens in der Gengruppe eine wichtige Rolle spielt. Durch Versetzen eines Gens an die Stelle eines anderen konnten sie nachweisen, dass sich das verschobene Gen entsprechend seiner neuen Position verhält und dass die Struktur des Chromatins eine übergeordnete Funktion hat.

Denis Duboule hat ausserdem zeigen können, dass die Kolinearitätsregel nicht nur auf die Genexpression entlang der Körperachse beschränkt ist; vielmehr gilt sie auch für die Entwicklung der Extremitäten. Durch die Kombination von klassischen embryologischen Experimenten mit molekularer Genetik hat er gezeigt, dass Hoxgene den Zellen in der Extremitätenknospe Positionsinformation vermitteln und dass ihre Aktivität durch Retinsäure reguliert wird. Jede Zelle innerhalb der Knospe «weiss» offenbar, wo sie sich befindet und signalisiert ihre Position an ihre Nachbarzellen. Anschliessend differenzieren sich die Zellen in der Extremitätenknospe entsprechend ihrer Position und bilden z.B. die wunderbaren Strukturen einer menschlichen Hand oder eines Vogelflügels aus.

Denis Duboule ist international anerkannt für seine Beiträge zum Verständnis der Morphogenese, und er hat fundamentale Beiträge zum Verständnis der molekularen und genetischen Grundlagen der Entwicklungsvorgänge geleistet. Es freut mich deshalb ganz besonders, dass er mit dem diesjährigen Cloëtta-Preis ausgezeichnet wird.

LE PRIX QUÉTAT 19[illegible]
EST DÉCERNÉ À

MONSIEUR

DENIS DUBOULE

PROFESSEUR ES SCIENCES

MEMBRE DE LA SOCIÉTÉ
PROFESSEUR AU DÉPARTEMENT DE ZOOLOGIE ET
BIOLOGIE ANIMALE DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE
POUR SES TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX
DANS LE DOMAINE DE L'ANALYSE GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT
DES VERTÉBRÉS.

DONNÉ LE 20 NOVEMBRE 19[illegible]

AU NOM DU CONSEIL DE LA FONDATION:

LE PRÉSIDENT: LE VICE-PRÉSIDENT:

LES MEMBRES:

Professor Dr. Denis Duboule

CURRICULUM VITAE

Name:	Duboule Denis
Status:	Married, four children
Date and place of birth:	17 February 1955, Geneva, Switzerland
Nationalities:	Swiss (Genève GE et St.Maurice VS), French
Languages spoken:	French mother tongue, English, (German)

Education:

1970 – 1975	Collège Rousseau, Geneva (high school, science major)
1975 – 1978	University of Geneva, Faculty of Sciences Degree in Biology
1978 – 1979	Diplom work in the laboratory of Prof. Karl Illmensee
1979 – 1984	Fellow of the Schmidheiny Foundation PhD. under the supervision of Prof. Karl Illmensee. Teaching assistant in experimental embryology
1984	PhD. obtained under the supervision of Prof. Hans Gloor: *Teratocarcinomas and Chimeric Mice: Application to the transfer of extra-specific genetic material in the mouse and its regulation.*

Positions:

1984 – 1986	Post-doctoral Fellow of the European Molecular Biology Organization (EMBO) in the laboratory of Prof. Pierre Chambon (Strasbourg).
1986 – 1988	Group Leader at the Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes (LGME, Prof. P. Chambon).

1988 – 1993	Group leader at the European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany (Differentiation Programme). Molecular genetics of vertebrate development.
1992 – present	Ordinary Professor of Biology in the Department of Zoology and Animal Biology. Director of the Laboratory of Molecular Embryology and Morphogenesis.

Professional Activities:

- European Editor of «Development»
- Associate Editor of the «EMBO J.» (1994–1996)
- Associate Editor of «Mechanism of Development».
- Associate Editor of «Genes to Cells».
- Associate Editor of the «International Journal of Dev. Biology».
- Associate Editor of the «International Journal of Molecular Medicine».

Honors:

- Elected member of EMBO
- Elected member of the *Academia Europaea*
- Corresponding member of the Sociéte de Biologie (Collège de France)
- National Latsis Price 1994
- Guest Professor at the Collège de France, Paris (1997)

GENETIC CONTROL OF LIMB MORPHOGENESIS AND EVOLUTION

Denis Duboule

Ever since Darwin's theory of evolution, the fundamental paradox of transformism, together with the origin of life, is the key question of biological sciences: How can animal species have the same biological ancestors and yet be so different from each others ? The answer to this question will probably come from the unravelling of developmental mechanisms at the molecular level. It is indeed by understanding our ontogenetic origin, i.e. our history as individuals, that we will understand our phylogenetic trajectory, i.e. our origin as a species, as a group of individuals. The reason for this lies in the mechanistic of evolution, which essentially acts by modifying developmental processes, hence by producing alternative forms or solutions to particular adaptative problems, through variations in the way these form are generated, rather than a posteriori. Much in the same way we can see how to improve the performances of an engine as soon as we understand how it works, a clear and detailed account of our developmental processes will ineluctably lead to a description of how they were modified in the course of evolution, hence how novel species could appear.

Limb development

In this context, vertebrate limbs are a good model system as they represent an amazing example of successful adaptation to various environmental conditions. In higher vertebrates, forelimbs help to fly, swim, walk, dig, grasp or play the Goldberg's variations, yet their basic structure (the primary sequence and spatial arrangement of bony elements) is always the same (1). This implies the existence of a unique developmental strategy for building a limb (a limb plan) that imposes early on a basic scheme, on the top of which subsequent species-specific customizations will occur. It is therefore an adequate system where the knowledge of the underlying developmental processes may shed light on

the evolution of the structure. The molecular description of a universal limb plan starts to emerge from recent advances in the fields of molecular and developmental genetics, largely through the use of genetic engineering and molecular biology. In tetrapods (vertebrates with four limbs), the limbs emerge from the trunk as buds (fig.1). After a few days, these buds are transformed into a well defined structure and present an organization almost identical to that of the adult appendages. At that time, one can distinguish three different parts which represent the basic subdivisions of the future limbs; the stylopodium (the arm), the zeugopodium (forearm) and the autopodium (the hand). This morphological transition, from a bud to an arm, is controled by the establishment of several signaling centers. Thus, in the distal region, the apical ectodermal ridge (AER) which maintains the proliferation of mesenchymal cells in a progress zone (PZ) and hence results in apical growth

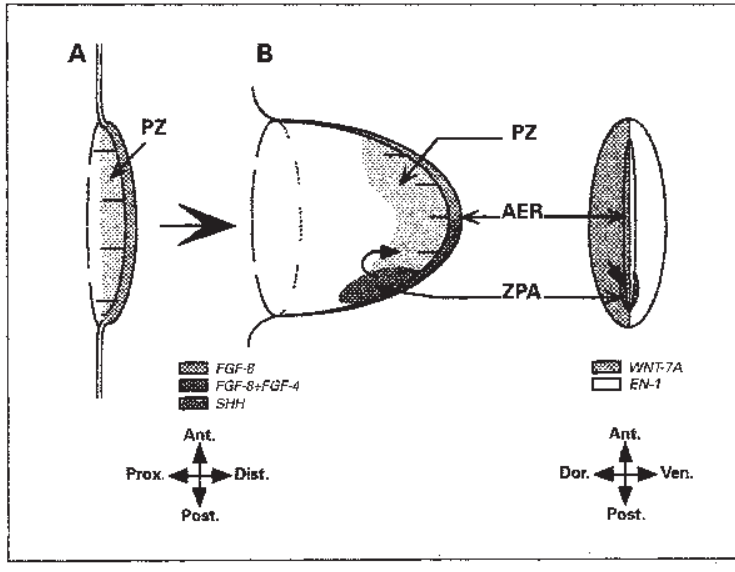


Figure 1.
(A) Budding of a limb out of the lateral plate mesoderm of the flank. A mass of mesenchyme cells starts to proliferate under the control of an *Fgf-8* expressing ectodermal layer. (B) Subsequent stages of limb budding with the establishment of the posterior signaling system relying upon the release of *Fgf-4* and *shh* secreted signals. The dorso ventral polarity is reflected by the unequal distribution of the *en-1* and *Wnt-7a* genes.

(see e.g. ref.2). This activity is required for the induction of a second zone located posteriorly (ZPA) and which seems to be responsible for an overproliferation of posterior cells (fig.1). This latter zone organizes the most distal parts of the limbs, the digits. Finally, these three regions interact with the limb dorsal and ventral ectoderm. Through a network of secreted factors, these different regions will control limb formation along the three different axes (fig.1).

The growth of the limbs is therefore essentially achieved within the progress zone where cells have a high mitotic index. Cells which escape this zone differentiate and condense to form cartilage blastema. These prechondrogenic condensations progress from proximal to distal meanwhile they will be split to give rise to different cartilage models, either by branching or by segmentation. In such a dynamic structure, growth and patterning are not dissociable. The consequence of this developmental strategy is that the stylopodium is patterned and produced before the forearm, which is itself produced before the extremities. This proximal to distal, unidirectional process, which links growth to patterning, depends in part upon the precisely orchestrated activation of the architect genes from the *Hox* family.

The Hox gene family

39 *Hox* genes are clustered in four different complexes, *HoxA, B, C* et *D,* in the genomes of higher vertebrates. They are all transcribed from the same DNA strand and encode transcription factors which bind DNA through an homeodomain peptide sequence. In the course of evolution, these four groups of genes appeared after duplications of an ancestral complex (3,4). A unique complex, which was split in two pieces in some athropods, is still present in most invertebrates. As a consequence of these amplifications (likely linked to global genomic amplifications), *Hox* genes can be classified into subfamilies following their respective positions in the various complexes (4). They thus define 13 groups of paralogy (see Fig.2). Interestingly, the expression of these genes, in space and time, is dictated by their positions in the chromosomes such that genes located at the 3' extremities of the complexes are expressed earlier and at more anterior positions along the body axis,

whereas genes located in 5' are expressed later and more posteriorly (5,6). In the developing limbs, this 'colinear' property is translated into an early and proximal expression for 3' genes and a late and distal expression for 5' located genes (fig.2). For example, group 9 genes are expressed in the future arm while group 13's are functional in the digits (fig.2). Depending on their belonging to particular complexes, vertebrate *Hox* genes show some specificities in their limb patterns. Thus, while both *Hoxd* and *Hoxa* genes are activated in the posterior region of the limb bud, *Hoxd* genes expression extend more anteriorly by maintaining an anterior to posterior polarity, while such a polarity is not observed with *Hoxa* genes.

The technology of embryonic stem (ES) cell culture and the possibility to carry out homologous recombinations in these cells has made

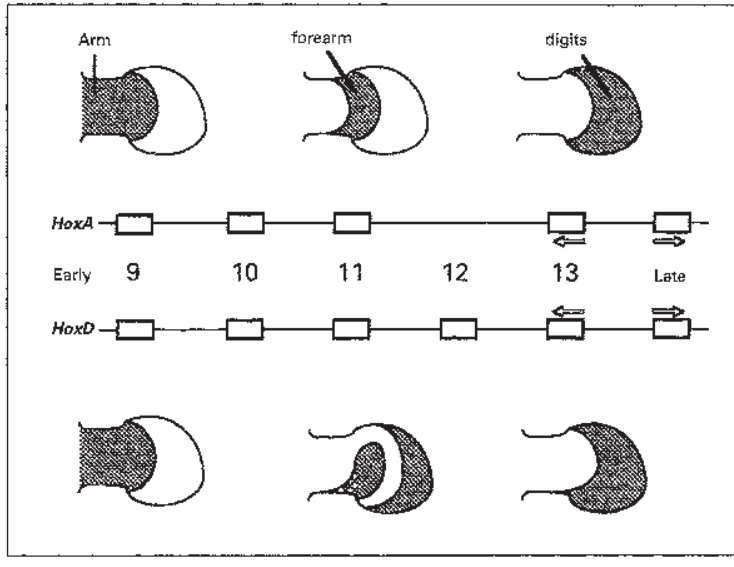


Figure 2.
Schematic of the genomic organisation of posterior *Hoxa* (top) and *Hoxd* (bottom) genes, with their expression domains during limb development. The genes (rectangles) are clustered in two different complexes and their proximal to distal restrictions in expression follows their positions in the complexes, such that group 9 are expressed in the arm, group 11 in the forearm and group 13 in the digits. There is therefore a correspondance between the linear order of the genes on the chromosome and the linear sequence of their expression domains.

possible to demonstrate the function of these *Hoxa* and *Hoxd* genes in limb patterning by generating loss of function targeted mutations. Thus, the absence of function of the last gene of the complex, *Hoxd-13*, leads to a general delay in the making of the digits (7). The metacarpals and phalangeal bones are illformed and the full hand presents caracteristics of a paedomorphic transformation, as if the extremities would not have been correctly finished, morphogenetically speaking, and therefore would have retained features typical of a younger developmental stage. In this particular case, adult mice have hands with a fetal pattern. Generally, alterations of the appendicular skeleton induced by these artificial inactivations of *Hoxa* et *Hoxd* genes are distributed following a proximal to distal polarity and thus affect different segments of the adult limbs, thus mimicking rather well their expression domains. For example, genes expressed early on, such as *Hoxd-9*, will have a crucial function in the growth and organization of the proximal arm (8), whereas *Hoxd-11* will work in the forearm (9-11), i.e. slightly later and more distally (fig.3). Consequently, mice with multiple mutations in group 11 genes will have no forearm (12), while mice lacking group 13 functions will be digitless (13), thus showing the critical

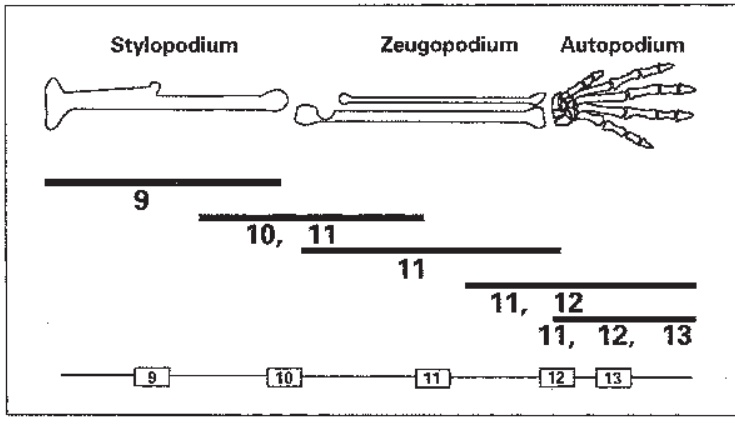


Figure 3.
Functional domains of posterior *Hoxd* genes based on their effect upon targeted mutations in vivo. The thick lines indicate which part of the limb is affected by mutations in genes belonging to group 9 to group 13. Group 13 genes are effective only in the digits while group 9 organize the arm. The forearm is patterned mostly by group 11 genes.

importance of these genes for the proper organization of our body plan. This function must operate at the levels of both the recruitment of cells for the prechondrogenic condensations leading to cartilage formation, and the subsequent proliferation of these cartilage models (14).
The fact that mutations within these genes lead to the absence of the corresponding structures, as well as their functions in proliferation, strongly suggested that they might have been involved in the evolutionary transition between an ancestral fin and the primitive limbs (15). In this novel scheme, this transition would essentially involve quantitative, rather than qualitative, variations in *Hox* gene expression. A prolonged and sustained expression of the distal genes, under the control of the posterior zone, could have led to the addition of a supplementary piece, the autopodium, on the top of an ancestral skeletal structure made out of the two most proximal pieces such as in *panderychtis* (see ref.15). Our analyses of the structure and expression of the same gene family in a teleost fish (*Danio rerio,* the zebrafish), has confirmed that these genes are expressed in a slightly different way which is compatible with such a scheme (16,17). These studies have also shown that genes responsible for the formation of digits in higher vertebrates can be found in fish as well, demonstrating that important morphological innovations may not rely on novel genes but instead, on the different use of preexisting genes, and that in this particular case, fish *Hox* genes must be used in a different context.

Understanding the molecular etiology of human syndromes

Recently, a novel aspect of the biology of *Hox* genes has come to the surface as several naturally occuring genetic syndromes have been reported in mice and human which involve genetic alterations within these particular *Hoxd* and *Hoxa* genes. Muragaki and colleagues (18) have reported that a mutation (triplet amplification) within the human *Hoxd-13* gene is linked to a particular type of synpolydactyly (SPD; OMIN No 186000). SPD, or type II syndactyly, is a human genetic disease which is caracterized by severe congenital malformations of the hands and feet, most notably due to the addition of an extra digit (polydactyly) and fusions of digits involving their proximal phalanges or

metacarpal and metatarsal bones (syndactyly). It is a semi-dominant mutation for which some homozygous patients have been scored who present a very severe phenotype, with a complete syndactyly of soft tissues, supernumerary carpal bones and important alterations of the phalangeal bones (18). Comparison between these phenotypes and those artificially produced in mice under laboratory conditions, has allowed us to propose an explanation regarding the mode of action of this genes and, consequently, the molecular etiology of the human syndrome which would derive from a so-called 'dominant negative' action of the human mutated protein (14). In this case, the mutation would not only abolish the human *Hoxd-13* function, but also interfere with that of the neighbouring genes leading to a stronger phenotype. This conclusion

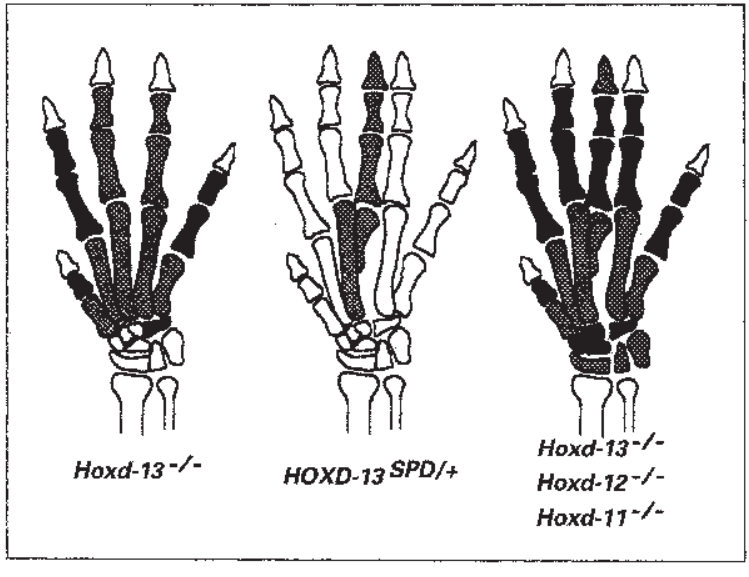


Figure 4.
Schematic representation of the skeletal alterations observed in either the loss of function of *Hoxd-13*, in mice (left), the triple loss of function of *Hoxd-11*, *Hoxd-12* and *Hoxd-13* in mice (right) or in the human *Hoxd-13* SPD mutation. In black, those bones strongly reduced, or missing; in grey, mildly affected bones. The triple mutant (right) is more severely affected than the simple mutant (left), thus showing the additive effect of these genes. When three mutations are combined in mouse, a supernumerary digit appears thus resembling the human phenotype obtained in a semi-dominant way, thereby illustrating the dominant negative function of the mutated human protein.

was reached after an engineered triple mutant was produced in transgenic mice (14). Their phenotype was found to be very similar to the semi-dominant phenotype of the human syndrome (fig.4). Likewise, another human syndrome, the hand-foot-genital syndrome has been recently linked to a small deletion within the coding regions of the *Hoxa-13* gene (19). Here again, work carried out with the murine system has dramatically helped to understand the molecular basis of this human genetic disease. The availablity of the different alleles in transgenic mice has allowed us to re-assess the early pathogenesis of these syndromes and thus to modify some mis-interpretation deriving from the study of human patients. For example, a careful analysis of the fetal development of these mutated animals has revealed that digit fusions were a secondary effect, linked to the polydactyly, rather than a primary effect due to branching problems, as original proposed after analysis of the human pathology.

Conclusions

In the past ten years, the discovery and further functional characterisation of these *Hox* genes in mice, has lead to a better understanding of some of the molecular mechanisms underlying limb development. Consequently, it has shed some light on the potential genetic events which have accompanied the fin to limb transition, an evolutionary step of critical importance since it allowed ancestral animals to further colonize the terrestrial environment and thus opened the way to the evolution of higher vertebrates. This convergence between developmental biology and the sciences of evolution is one of the powerful synergistic interface that has been recently established through the use of genetic engineering and transgenic animals, and the ever increasing number of human genetic syndromes which are recognized as deriving from mutations in developmental control genes remind us that many human genetic diseases are nothing else than alterations in our developmental programme. In the next century, the future integration, in this network of disciplines, of the global genomic approach, will no doubt provide us with a knowledge of both our ontogenetic and phylogenetic origins that nobody would have dared to dream of fifteen years ago.

Acknowledgements

The work carried out in this laboratory for the past ten years was made possible only by the talent of past and present colleagues and collaborators. I am very grateful to all of them and wish them to enjoy research as much as I do. I am indeebted to Pierre Chambon and Walter Gehring for their constant support throughout these years, as well as to the Swiss National Research Fund, the Canton de Genève, the Human Frontier Programme and the Claraz and Latsis foundations for their critical financial support.

REFERENCES

1. Duboule D. How to make a limb? Science, (1994), 266, 575-576.

2. Tickle C. Vertebrate limb development. Cur. Opi. Gen. Dev. (1995), 5, 478-484.

3. W. McGinnis and R. Krumlauf. Homeobox and axial patterning. Cell, (1992), 68, 283-302.

4. Duboule D. (editor) (1994) A guidebook to homeobox genes. Oxford University Press.

5. Duboule D. and Dollé P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. EMBO J. (1989) 8, 1497-1505.

6. Graham A., Papalopulu N. and Krumlauf R. The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. Cell (1989) 57, 367-378.

7. Dolle P., Dierich A., Schimmang T., Chambon P. and Duboule, D. Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. Cell (1993), 75, 431-441.

8. Fromental-Ramain C. et al. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. Development (1996), 122, 461-472.

9. Favier B., Le Meur M., Chambon P. and Dolle P. Axial skeleton homeosis and forelimb malformations in Hoxd-11 mutant mice. Proc Natl Acad Sci USA (1995), 92, 310-314.

10. Davis A. P. and Capecchi M. R. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of hoxd-11. Development (1991), 120, 2187-2198.

11. Favier B., Rijli F. M., Fromental-Ramain C., Fraulob V., Chambon P. and Dollé P. Functional cooperation between the non-paralogous genes Hoxa-10 and Hoxd-11 in the developing forelimb and axial skeleton. Development (1996), 122, 449-460.

12. Davis A. P., Witte D. P., Hsieh-Li H. M., Potter S. S. and Capecchi M. R. Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11. Nature (1995), 375, 791-795.

13. Fromental-Ramain C., Warot X., Messadecq M., LeMeur M., Dollé P. and Chambon P. Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. Development (1996), 122, 2997-3011.

14. Zákány J. and Duboule D. Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the HoxD complex. Nature (1996), 384, 69-71.

15. Sordino P. and Duboule D. A Molecular Approach to the Fin to Limb transition. Trends in Eco. Evol. (1996) , 11, 114-119.

16. Sordino P., van der Hoeven F. and Duboule D. - Hox gene expression in teleost fins and the origin of vertebrate digits. Nature (1995), 375, 678-681.

17. Sordino P., Duboule D. and Kondo T. Zebrafish Hoxa and Evx-2 genes: Cloning, developmental expression and implications for the functional evolution of posterior Hox genes. Mech. Dev. (1996) 59, 165-175.

18. Muragaki Y., Mundlos S., Upton J. and Olsen B. R. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. Science (1996), 272, 548-551.

19. Mortlock D. P. and Innis J. W. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. Nature Genet. (1997) 15, 179-180.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Duboule D., Croce C. M. and Illmensee K. (1982). Tissue preference and differentiation of a malignant rat x mouse hybrid cells in chimaeric mouse fetuses. EMBO J. 1, No.12 1959-1603.

2. Duboule D., Petzoldt U., Illmensee G. R., Croce C. M. and Illmensee K. (1982). Protein synthesis in hybrid cells derived form fetal rat x mouse chimeric organs. Differentiation 23, 145-152.

3. Duboule D. (1984). Teratomas and chimeras: Application to the transfer of extra-specific genetic material in the mouse and its regulation. Ph.D. thesis, Imprimerie Nationale, Genève.

4. Duboule D., (1984). Genetic manipulation of the mammalian embryo: results and prospects. In: Embryotransfer Erbgutveränderungen Auswirkung auf die Tierzüchterische Praxis. Benteli Verlag, Bern, pp. 44-47.

5. Duboule D. and Bürki K. (1985). A fine analysis of glucose phosphate isomerase patterns in single preimplantation mouse embryos. Differentiation 29, 25-28.

6. Sassone-Corsi P., Duboule D. and Chambon P. (1985). Viral enhancer activity in teratocarcinoma cells. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol. 50, 747-752.

7. Duboule D., Baron A., Mähl P. and Galliot B. (1986). A new homeo-box is present in overlapping cosmid clones which define the mouse Hox-1 locus. EMBO J. 5, 1973-1980.

8. Gaunt S.J., Miller J.R., Powell D.J. and Duboule D. (1986). Homeo-box gene expression in mouse embryos varies with position by the primitive streak stage. Nature 324, 662-664.

9. Martin G., Boncinelli E., Duboule D., Gruss P., Jackson I., Krumlauf R., Lonai P., McGinnis W., Ruddle F. and Wolgemuth D. (1987). Nomenclature for homeo-box-containing genes. Nature 325, 21-22.

10. Duboule D., Haenlin M., Galliot B. and Mohier E. (1987). DNA sequences homologous to the Drosophila opa repeat are present in fetuses and adult tissues. Mol. Cell. Biol., 7, 2003-2006.

11. Baron, A., Featherstone, M. F., Hill, B. Hall, A., Galliot, B. and Duboule, D. (1987). Hox1-6, a new mouse homeobox containing gene member of the Hox-1 complex. EMBO J 6, 2977-2086.

12. Featherstone, M., Baron, A., Gaunt, S., Mattei, M.- G. and Duboule, D. (1988). Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus in mouse chromosome 2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 4760-4764.

13. Gaunt S. J., Sharpe P. T. and Duboule D. (1988). Spatially restricted domains of homeo-gene transcripts in mouse embryos: relation to a segmented body plan. Development, 104, 169-179.

14. Duboule D., Galliot B., Baron A. and Featherstone M. S. (1989). In: Cell to Cell Signals in Mammalian Development, NATO Advanced Study Institute Series, eds de Laat, S., Bluemink, J. G. & Mummery, C. L. (Springer, Berlin) 97-108.

15. Duboule D. and Dollé P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. EMBO J 8, 1497-1505.

16. Dollé P. and Duboule D. (1989). Two genes members of the murine HOX-5 complex show regional and cell-type specific expression in developing limbs and gonads. EMBO J 8, 1507-1515.

17. Galliot B., Dollé P. and Duboule D. (1989). The organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. Cur. Com. in Mol. Biol. CSH press.

18. Galliot B., Dollé P., Vigneron M., Featherstone M. S., Baron A. and Duboule D. (1989). The mouse Hox-1.4 gene: primary structure evidence for promoter activity and expression during development. Development 107, 343-359

19. Gaunt S. J., Krumlauf R. and Duboule D. (1989). Mouse homeogenes within a subfamily, Hox-1.4, Hox-5.1 and Hox-2.6 display similar anteposterior domains of transcription in the embryo, but show stage- and time-dependent differences in their regulation. Development 107, 131-141.

20. Duboule D., Dollé P. and Gaunt S. J. (1990). Les genes du developpement des mammiferes, La Recherche, 219, 294-303.

21. Dollé P., Izpisúa-Belmonte J.-C., Falkenstein H., Renucci A. and Duboule D. (1989). Coordinate expression of the murine HOX-5 homeobox containing gene during limb pattern formation, Nature, 342, 767-772.

22. Stubbs L., Huxley C., Hogan B., Evans T., Fried M., Duboule D. and Lehrach H. (1990). The Hox-5 and Surfeit clusters are linked in the proximal portion of mouse chromosome 2. Genomics 6, 645-650.

23. Siracusa L., Silan C., Justice M., Mercer J., Bauskin A., Ben-Nehria Y., Duboule D., Hastie N., Copeland N. and Jankins N. (1990). A molecular genetic map of mouse chromosome 2. Genomics, 6, 491-504.

24. Stubbs L., Poustka A., Baron A., Lehrach H., Lonai P. and Duboule D. (1990). The murine genes Hox-5.1 and Hox-4.1 belong to the same complex on chromosome 2. Genomics 7, 422-427.

25. Chavrier P., Vesque C., Galliot B., Vigneron M., Dollé P., Duboule D and Charnay P. (1990). The segment specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene. EMBO J, 9, 1209-1218.

26. Duboule D., Boncinelli E., DeRobertis E., Featherstone MS., Lonai P., Oliver G. and Ruddle F. (1990). An update of mouse and human HOX genes nomenclature. Genomics, 7, 458-459.

27. Izpisúa-Belmonte J.C., Dollé P., Renucci A., Zappavigna V., Falkenstein H. and Duboule D. (1990). Primary structure and embryonic expression pattern of the mouse Hox-4.3 homeobox gene. Development, 110, 733-746.

28. Dollé P., Ruberte E., Izpisúa-Belmonte J.C., Falkenstein H., Chambon P. and Duboule D. (1991). A comparison of the expression domains of the murine HOX-4, RARs and CRABP genes suggests possible functional relationships during patterning of the vertebrate limb. In: Developmental patterning of the vertebrate limb (eds J. R. Hinchliffe et al.) Plenum Press, New York. pp 65-73.

29. Zappavigna V., Dollé P., Izpisúa-Belmonte J-C. and Duboule D. (1991). The Hox-4 genes and the molecular bases of pattern formation. In: Proceedings of the FISME, Forabosco A., DiNatale P., Lungarotti M.S., Neri G. eds., (Monduzzi, Bologna).

30. Izpisúa-Belmonte J.C., Falkenstein H., Dollé P., Renucci A. and Duboule D. (1991). Murine genes related to the Drosophila AbdB homeotic gene are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. EMBO J. 10, 2279-2289.

31. Izpisúa-Belmonte J-C., Tickle C., Dollé P., Wolpert L. and Duboule D. (1991). Expression of the homoeobox HOX-4 genes and the specification of positional information in chick limb development. Nature, 350, 585-589.

32. Price M., Lemaistre M., Pischetola M., DiLauro R. and Duboule D. (1991). A mouse distal-less related homeobox gene shows a restricted expression in the developing forebrain. Nature, 351, 748-751.

33. Duboule D. (1991). Patterning in the vertebrate limb. Curr. Opin. Genet. Dev., 1, 211-216.

34. Dollé P., Izpisúa-Belmonte J-C., Boncinelli E. and Duboule D. (1991). The Hox-4.8 gene is localised at the 5' end of the HOX-4 complex and is expressed at the posterior extremity of the body during development. Mech. Dev., 36, 3-14.

35. Zappavigna V., Renucci A., Izpisúa-Belmonte J.-C., Urier G., Peschle C. and Duboule D. (1991). HOX4 genes encode transcription factors with potential auto- and cross-regulatory capacities. EMBO J. 10, 4177-4187.

36. Dollé P., Izpisúa-Belmonte J.-C., Tickle C., Brown J. and Duboule D. (1991). Hox-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. Genes Dev. 5, 1767-1776.

37. Dollé P. and Duboule D. (1992). L'hybridation in situ et les gènes Hox dans l'étude de la morphogenèse. In «Hybridation in situ. Méthodes pratiques» (eds Calas, Bloch, Fournier and Trembleau, Paris) pp 95-103.

38. Izpisúa-Belmonte J.-C., Dollé P. and Duboule D. (1992). Hox genes and the molecular bases of vertebrate limb pattern formation. Seminars in Development, 2, 385-392.

39. Izpisúa-Belmonte J-C., Dollé P., Tickle C., Wolpert L. and Duboule D. (1992). HOX-4 genes, retinoic acid and the specification of positional information during chick wing morphogenesis. In: Retinoids in normal development and teratogenesis (ed. G. Morriss-Kay) Oxford Science Publications. pp 241-248.

40. Price M., Lazzaro D., Pohl T., Mattei M-G., Ruether U., Olivo J-C., Duboule D. and DiLauro R. (1992). Regional expression of the homeobox gene NKX-2.2 in the developing mammalian forebrain. Neuron, 8, 241-255.

41. Dollé P., Price M. and Duboule D. (1992). Expression of the mouse Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development. Differentiation, 49, 93-100.

42. Renucci A., Zappavigna V., Zakany J., Izpisúa-Belmonte J-C., Bürki K. and Duboule D. (1992). Comparison of mouse and human Hox-4 complexes defines conserved promoter sequences involved in the regulation of the Hox-4.4 gene. EMBO J. 11, 1459-1468.

43. Izpisúa-Belmonte J.-C., D. A. Ede, C. Tickle and Duboule D. (1992). The misexpression of posterior Hox-4 genes in talpid3 mutant wings correlates with the absence of antero-posterior polarity. Development, 114, 959-963.

44. Izpisúa-Belmonte J.-C., J. M., Brown, Crowley A., Duboule D. and Tickle C. (1992). Hox-4 gene expression in mouse/chicken heterospecific grafts of signalling regions to limb buds reveal similarities in patterning mechanisms. Development, 115, 553-560..

45. Izpisúa-Belmonte J.-C., J. M. Brown, Duboule D. and Tickle C. (1992). Expression of Hox-4 genes in the chick wing links pattern formation to the epithelial-mesenchymal interactions that mediate growth. EMBO J. 11, 1451-1458.

46. Bastian H., Gruss P., Duboule D. and Izpisúa-Belmonte J.-C. (1992). The murine even-skipped like gene Evx-2 is closely linked to the Hox-4 complex but is transcribed in the opposite direction. Mammalian Genome, 3, 241-243.

47. Duboule D. (1992). The vertebrate limb, temporal colinearity and the Hox/HOM gene network. BioEssays, 14, 375-384.

48. Izpisúa-Belmonte J.-C. and Duboule D. (1992). Homeobox genes and pattern formation in the vertebrate limb. Dev. Biol. 152, 26-36.

49. Morgan B. A., Izpisúa-Belmonte J.-C., Duboule D. and Tabin C. J. (1992). Targeted misexpression of Hox-4.6 in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. Nature, 358, 236-239.

50. Dollé P. and Duboule D. (1993). Structural and functional aspects of mammalian Hox genes. In: Advances in Developmental Biochemistry, Vol. 2, (ed. P. Wassarman), JAI Press Inc., pp. 55-106.

51. Duboule D. (1993). The function of Hox genes in the morphogenesis of the vertebrate limb. Annales de Génétique, 36, 24-29.

52. Renucci A., Urier G., Gérard M. and Duboule D. (1993). Controle des gènes Hox au cours du développement des vertèbres: Apport de la transgénese. Méd. Sci., 9, 157-164.

53. Dollé P., Izpisúa-Belmonte J.-C., Brown J., Tickle C. and Duboule, D. (1993). Hox genes and the morphogenesis of the vertebrate limb. in «Limb Development and Regeneration» (eds. J. Fallon, P. Goetinck, R. Kelley, D. Stocum) Wiley-Liss, pp. 11-20.

54. Dollé P., Lufkin T., Krumlauf R., Mark M., Duboule D. and Chambon P. (1993). Local alterations of Krox-20 and Hox gene expression in the hindbrain of Hox-1.6 null embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 7666-7670.

55. Zákány J. and Duboule D. (1993). Expression of the Wnt-1 gene in developing limbs correlates with abnormalities in growth and skelettal patterning. Nature, 362, 546-549.

56. Olivo J.-C., Izpisúa-Belmonte J.-C., Tickle C., Boulin C. and Duboule D. (1993). Hox genes expression in chicken wing buds: A spatial reconstruction that allows a simultaneous view of multiple expression domains. BioImaging, 1, 151-158.

57. Gérard M., Duboule D. and Zakany J. (1993). Structure and activity of regulatory elements involved in the activation of the Hoxd-11 gene during late gastrulation. EMBO J., 12, 3539-3551.

58. Dollé P., Dierich A., LeMeur M., Schimmang T., Schuhbaur B., Chambon P. and Duboule D. (1993). Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. Cell, 75, 431-441.

59. Gérard M., Duboule D. and Zakany J. (1993). Cooperation of regulatory elements involved in the activation of the Hoxd-11 gene. C.R.A.S., 316, 985-989.

60. Fjose A., Izpisúa-Belmonte J.-C., Fromental-Ramain C. and Duboule D. (1994). Expression of the novel zebrafish gene hlx-1 in the prechordal plate and during CNS development. Development, 120, 71-81.

61. Bachiller D., Macias A., Duboule D. and Morata G. (1994). Conservation of a functional hierarchy between mammalian and insect Hox/HOM genes. EMBO J. 13, 1930-1941.

62. Duboule D. and Morata G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. Trends Genet., 10, 358-364.

63. Duboule D. (1994). Temporal colinearity and the phylotypic progression: A basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. Development (supp.), 135-142.

64. Dollé P., Fraulob V. and Duboule D. (1994). Developmental expression of the mouse Evx-2 gene: Relationship with the evolution of the Hox/HOM complex. Development (supp.), 143-153.

65. Duboule D., (1994). How to make a limb ? Science, 266, 575-576.

66. Zakany J., Lemaistre M. and Duboule D. (1995). Ectopic expression of Wnt-1 induces abnormalities in growth and skeletal patterning of the limbs. In: Organisation of the vertebrate embryo. (eds. N. Zagris, A.-M. Duprat, T. Durston) Plenum press. 315-321.

67. Kanzler Viallet, LeMouellic H., Duboule D. Boncinelli E. and Dhouailly D. (1994). Differential expression of two different homeobox gene families during mouse tegument morphogenesis. Int. J. of Dev. Biol. 38, 633-640.

68. Sordino P., Van der Hoeven F. and Duboule D. (1995). Hox gene expression in fins and the origin of vertebrate digits. Nature, 375, 678-681.

69. Duboule D. (1995). Vertebrate Hox genes and proliferation: an alternative pathway to homeosis? Curr. Opin. Genet. Dev., 5, 525-528.

70. Van der Hoeven F., Sordino P., Fraudeau N., Izpisua-Belmonte J.-C. and Duboule D. (1996). Teleost HoxD and HoxA genes: Comparison with tetrapods and functional Evolution of the HoxD complex. Mech. Dev., 54, 9-21.

71. Sordino P. and Duboule D. (1996). A Molecular Approach to the Fin to Limb transition. Trends in Eco. Evol., 11, 114-119.

72. Duboule D. and Sordino P. (1996). From fins to limbs: Towards a molecular approach to the evolution of vertebrate paired appendages. Med. Sci., 12, 147-154.

73. Zakany J., Gérard M., Favier B., Potter S. and Duboule D. (1996). Functional equivalence and rescue amongst group 11 Hox gene products in vertebral patterning. Dev. Biol., 176, 325-328.

74. Kondo T., Zakany J., Dollé P. and Duboule D. (1996). Function of posterior Hoxd genes in the morphogenesis of the anal sphincter. Development, 122, 2651-2659.

75. Van der Hoeven F., Zakany J. and Duboule D. (1996). Gene transpositions in the Hoxd complex reveal a hierarchy of regulatory controls. Cell, 85, 1025-1035.

76. Gérard M., Chen J.-Y., Gronemeyer H., Chambon P., Duboule D. and Zakany J. (1996). In vivo targeting of a regulatory element required for positioning the Hoxd-11 and Hoxd-10 expression boundaries. Genes Dev., 18, 2326-2334.

77. Sordino P., Duboule D. and Kondo T. (1996). Zebrafish Hoxa and Evx-2 genes: Cloning, developmental expression and implications for the functional evolution of posterior Hox genes. Mech. Dev, 59, 165-175.

78. Beckers J., Gérard M. and Duboule D. (1996). Transgenic analyses of a potential Hoxd-11 limb regulatory element present in tetrapods and fish. Dev. Biol., 180, 543-553.

79. Hérault Y., Rahba-Renevey, S., van der Hoeven, F. and Duboule, D. (1996). Function of the Evx-2 gene during digit development. EMBO J, 15, 6727-6738.

80. Hérault, Y. and Duboule, D. (1996). Le contrôle génétique de la fabrication des membres. Annales Gen., 39, 222-232.

81. Zakany J. and Duboule D. (1996). Synpolydactyly in Mice with a Targeted deficiency in the HoxD complex. Nature, 384, 69-71.

82. Podlasek C., Duboule D. and Bushman W. (1996). Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. Dev. Dyn., In press.

83. Hérault Y., Kondo T., Zakany J. and Duboule D. (1997). Les gènes Hox et le contrôle génétique de la fabrication des membres. Archives Pédiatric, 4, 107-111.

84. Hérault Y. and Duboule D. (1997). Des Gènes et des Doigts, La Recherche, in press.

85. Duboule D. and Sordino P. (1997). L'origine des doigts, La Recherche, 296, 66-69.

86. Hérault Y. and Duboule D. (1997). The control of limb morphogenesis by Hox genes. C. R. Soc. Biol, 191, 21-27.

87. Zakany J., Gérard M., Favier B. and Duboule D. (1997). Deletion of a HoxD enhancer induces transcriptional heterochrony leading to transposition of the sacrum. EMBO J., in press.

88. Zeller R. and Duboule D. (1997). Dorso-ventral limb polarity and origin of the ridge: on the fringe of independence? BioEssays, 19, 541-546.

89. Gérard M., Zakany J. and Duboule D. (1997). Interspecies exchange of a HoxD enhancer in vivo induces premature transcription and anterior shift of the sacrum. Dev. Biol., in press.

90. Hérault Y., Fraudeau N., Zakany J. and Duboule D. (1997). Ulnaless (Ul), a regulatory mutation inducing both loss- and gain of function of posterior Hox genes. Development, in press.

BOOK

Duboule, D. (editor) (1994). A guidebook to homeobox genes. Oxford University Press

Übersicht über die bisher erschienenen Publikationen der Schriftenreihe Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta

Heft Nr. 1 (5. Auflage 1997):
Vorwort von Bundesrätin Ruth Dreifuss
Biographie von Professor Dr. Max Cloëtta
Biographie von Dr. Antoine Cloëtta
Übersicht über die Stiftung Professor Dr. Max Cloëtta
Ehrentafel der Preisträger
Organe der Stiftung

Heft Nr. 2:
Preisverleihung 1974
Festvortrag des Preisträgers Dr. med. Urs A. Meyer:
«Klinische Pharmakologie – eine Herausforderung für interdisziplinäre Zusammenarbeit»

Heft Nr. 3:
Preisverleihung 1975
Festvortrag des Preisträgers Dr. med. Hans Bürgi:
«Die Bekämpfung des Kropfes in der Schweiz. Ein Beispiel der Zusammenarbeit zwischen Grundlagenwissenschaftern, Klinikern und Behörden»

Heft Nr. 4:
Cérémonie de remise du prix 1976
Exposé du Dr Rui C. de Sousa, sur le thème:
«La membrane cellulaire: une frontière entre deux mondes»

Heft Nr. 5:
Preisverleihung 1977
Festvortrag des Preisträgers Professor Dr. Franz Oesch:
«Chemisch ausgelöste Krebsentstehung»

Heft Nr. 6:
Preisverleihung 1978
Festvortrag des Preisträgers Dr. Susumu Tonegawa:
«Cloning of Immunoglobulin Genes»

Heft Nr. 7:
Preisverleihung 1979
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Theodor Koller:
«Die strukturelle Organisation des genetischen Apparates höherer Organismen»
Professor Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl:
«Hormonal Control of the Differentiation of the Mammary Gland»

Heft Nr. 8:
Preisverleihung 1980
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Edward W. Flückiger:
«Neue Aspekte der Mutterkorn-Pharmakologie»
PD Dr. Albert Burger:
«Ein Vierteljahrhundert nach Entdeckung des aktivsten Schilddrüsenhormons (Trijodothyronin)»

Heft Nr. 9:
Preisverleihung 1981
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Rolf Zinkernagel:
«"Selbst"-Erkennung in der Immunologie»
Professor Dr. Peter A. Cerutti:
«A role for active oxygen species in human carcinogenesis?»

Heft Nr. 10:
Preisverleihung 1982
Festvorträge der beiden Preisträger
PD Dr. Jürgen Zapf:
«Wachstum und Wachstumsstörungen: ein gemeinsames Forschungsziel der klinischen und experimentellen Endokrinologie»
PD Dr Jean-Michel Dayer:
«Le monocyte-macrophage: un pivot entre le système immun et le tissu conjonctif dans le processus inflammatoire de l'arthrite rhumatoïde»

Heft Nr. 11:
Preisverleihung 1983
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Peter Böhlen:
«Peptides and Proteins as messengers in the communication between cells and organs»
PD Dr. Claes B. Wollheim:
«Regulation of insulin release by intracellular calcium»

Heft Nr. 12:
Preisverleihung 1984
Festvorträge der beiden Preisträger
Frau Professor Dr. Heidi Diggelmann:
«Beiträge der Retroviren zur Aufklärung grundlegender biologischer Prozesse»
Professor Dr. Jean-François Borel:
«Entwicklung und Bedeutung des Ciclosporins»

Heft Nr. 13:
Preisverleihung 1985
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Hans Thoenen:
«Entwicklungsneurobiologie; von der deskriptiven Analyse zum molekularen Verständnis»
Dr. Roberto Montesano:
«Cell-Extracellular Matrix Interactions in Organogenesis»

Heft Nr. 14:
Preisverleihung 1986
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Ueli Schibler:
«Mechanismen der gewerbespezifischen Regulation von Genen»
Professor Dr. Walter Schaffner:
«Enhancer-Sequenzen und die Regulation der Gen-Transkription»

Heft Nr. 15:
Preisverleihung 1987
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Jacques Louis:
«Rôle des lymphocytes T spécifiques sur l'évolution des lésions induites par leishmania major, un parasite vivant dans les macrophages de leur hôte»
Professor Dr. Joachim H. Seelig:
«Magnetische Resonanz – ein "magnetisches Auge" zur Untersuchung der Lebensvorgänge in vivo»

Heft Nr. 16:
Preisverleihung 1988
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Jean-Dominique Vassalli:
«Protéolyse et migrations cellulaires: Multiples facettes du contrôle d'une cascade enzymatique»
PD Dr. Hans Hengartner:
«Über die immunologische Toleranz»

Heft Nr. 17:
Preisverleihung 1989
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Heini Murer:
«Parathormon: Auf dem Weg zum Verständnis seiner Wirkung im proximalen Tubulus»
Dr. Hugh Robson MacDonald:
«Selection of the T Cell Antigen Receptor Repertoire during Development»

Heft Nr. 18:
Preisverleihung 1990
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Martin E. Schwab:
«Entwicklung, Stabilisierung und Regeneration von Faserverbindungen in Gehirn und Rückenmark: Die Rolle von Nervenwachstums-Hemmstoffen»
Professor Dr. Denis Monard:
«Protéases et inhibiteurs extracellulaires dans le système nerveux»

Heft Nr. 19:
Preisverleihung 1991
Festvorträge der beiden Preisträger
PD Dr. Peter J. Meier-Abt:
«Die Ausscheidungsfunktionen der Leber: Rolle von Membrantransport-Systemen»
PD Dr. Jacques Philippe:
«Structure and pancreatic expression of the insulin and glucagon genes»

Heft Nr. 20:
Preisverleihung 1992
Festvorträge der beiden Preisträger
PD Dr. Leena Kaarina Bruckner-Tuderman:
«Molecular Pathology of the Epidermal-Dermal Interface in Skin»
Professor Dr. Jürg Tschopp:
«Das Phänomen der von Lymphozyten vermittelten Zellyse»

Heft Nr. 21:
Preisverleihung 1993
Festvorträge der drei Preisträger
Dr. Paolo Meda:
«Cell-to-cell Communication and Pancreas Secretion»
Professor Dr. Adriano Fontana:
«Transforming Growth Factor Beta 2, ein von Tumorzellen gebildetes Zytokin mit immunparalysierender Wirkung»
Professor Dr. Michel Aguet:
«Neue Erkenntnisse zur Biologie und Molekularbiologie der Interferone»

Heft Nr. 22:
Preisverleihung 1994
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. rer. nat. Hans Rudolf Brenner:
«Die Regulation der Expression synaptischer Transmitter-Rezeptoren während der Synapsenbildung»
Daniel Pablo Lew, Professeur ordinaire de médecine:
«Signal Transduction and Ion Channels Involved in the Activation of Human Neutrophils»

Heft Nr. 23:
Preisverleihung 1995
Festvorträge der beiden Preisträger
Professor Dr. Jürg Reichen:
«Die sinusoidale Endothelzelle und Leberfunktion»
Dr. George Thomas jr.:
«The $p70^{s6k}$ Signal Transduction Pathway, S6, Phosphorylation and Translational Control»

Heft Nr. 24:
Preisverleihung 1996
Festvorträge der beiden Preisträger
Dr. Lukas C. Kühn:
«Molekulare Mechanismen zur Steuerung des Eisenstoffwechsels»
Professor Dr. Peter Sonderegger:
«Wegweiser- und Sensormoleküle beim gezielten Wachstum der Nervenzellausläufer»

EHRENTAFEL
DER PREISTRÄGER

1974 Dr. Urs A. Meyer

1975 PD Dr. Hans Bürgi

1976 Dr. Rui de Sousa

1977 Prof. Dr. Franz Oesch

1978 Dr. Susumu Tonegawa

1979 Prof. Dr. Theodor Koller
Prof. Dr. Jean-Pierre Kraehenbuehl

1980 Prof. Dr. Edward W. Flückiger
PD Dr. Albert Burger

1981 Prof. Dr. Rolf M. Zinkernagel
Prof. Dr. Peter A. Cerutti

1982 PD Dr. Jürgen Zapf
PD Dr. Jean-Michel Dayer

1983 Prof. Dr. Peter Böhlen
PD Dr. Claes B. Wollheim

1984 Prof. Dr. Heidi Diggelmann
Prof. Dr. Jean-François Borel

1985 Prof. Dr. Hans Thoenen
Dr. Roberto Montesano

1986 Prof. Dr. Walter Schaffner
Prof. Dr. Ueli Schibler

1987 Prof. Dr. Jacques Louis
Prof. Dr. Joachim H. Seelig

1988 Prof. Dr. Jean-Dominque Vassalli
PD Dr. Hans Hengartner

1989 Prof. Dr. Heini Murer
Dr. Hugh Robson MacDonald

EHRENTAFEL
DER PREISTRÄGER

1990 Prof. Dr. Martin E. Schwab
Prof. Dr. Denis Monard

1991 PD Dr. Peter J. Meier-Abt
PD Dr. Jacques Philippe

1992 PD Dr. Leena Kaarina Bruckner-Tudermann
Prof. Dr. Jürg Tschopp

1993 Dr. Paolo Meda
Prof. Dr. Adriano Fontana } Jubiläumsjahr
Prof. Dr. Michel Aguet

1994 Prof. Dr. Hans Rudolf Brenner
Prof. Dr. Daniel Pablo Lew

1995 Prof. Dr. Jürg Reichen
Dr. George Thomas jr.

1996 Dr. Lukas C. Kühn
Prof. Dr. Peter Sonderegger

1997 Dr. Gérard Waeber
Professor Dr. Denis Duboule