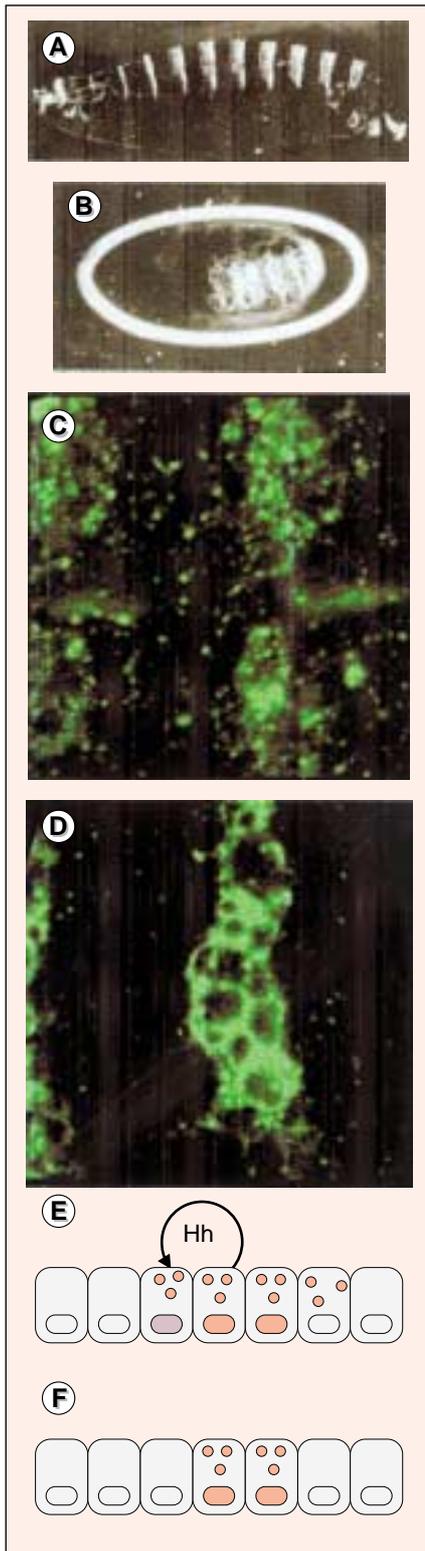


## Rôle des protéoglycanes dans la distribution du facteur sécrété Hedgehog

Les facteurs sécrétés de la famille Hedgehog (Hh) interviennent au cours du développement embryonnaire en activant une voie de transduction conservée au cours de l'évolution [1] (*m/s* 1998, n° 3, p. 603-6). La dérégulation de cette voie de transduction est associée chez l'homme à différents syndromes. Certains de ces syndromes sont caractérisés par une prédisposition accrue au cancer (pour revue, voir [2] et *m/s* 1997, n° 3, p. 402). Pour ne citer qu'un exemple, le syndrome de Gordin, associé à une haplo-insuffisance au locus *patch* (*Ptc*), codant pour le récepteur de Hh, s'accompagne d'une incidence élevée d'épithéliomas cutanés basocellulaires (*m/s* 1998, n° 3, p. 373). Au cours du développement, les molécules Hh agissent dans de nombreux cas de manière paracrine, c'est-à-dire qu'elles agissent sur les cellules adjacentes à celles qui les produisent. Toutefois, les mécanismes moléculaires contrôlant la distribution de ces protéines au sein d'un tissu restent en grande partie inconnus. Rappelons l'originalité des molécules de la famille Hedgehog qui sont liées de manière covalente à un groupement cholestérol (*m/s* 1997, n° 2, p. 229). Au cours d'une étude chez la drosophile, destinée à identifier des gènes requis au cours de l'embryogenèse précoce, nous avons isolé, entre autres, un gène nommé *tout-velu* (*ttv*) (*m/s* 1998, n° 10, p. 1146) dont la mutation se manifeste par un phénotype similaire à la mutation du gène *hh* [3]. Les noms hedgehog et tout-velu font référence aux phénotypes des larves mutantes pour les gènes *hh* ou *ttv* dont l'ensemble de la cuticule est recouverte de soie (*figure 1A* et

*1B*). Cette similarité du phénotype des larves mutantes suggérerait l'intervention de *ttv* dans la voie de transduction du signal de Hh. Le gène *ttv* code pour un homologue des molécules de la famille Ext chez l'homme (*m/s* 1996, n° 6, p. 836; 1996, n° 1, p. 111; 1996, n° 12, p. 1444). Ces molécules ont été identifiées chez l'homme comme associées au syndrome HME (*hereditary multiple exostoses*) qui se traduit par l'apparition d'excroissances osseuses (exostoses) au niveau des os formés par ossification endochondrale et par une prédisposition aux chondrosarcomes et ostéosarcomes [4]. De manière intéressante, l'une des trois molécules de la famille Hh chez la souris, la molécule Indian Hedgehog (*Ihh*) joue un rôle-clé au cours du développement osseux [5] (*m/s* 1996, n° 10, p. 1111). A l'époque, la fonction de la protéine Ttv dans la transduction du signal Hh demeurerait difficile à établir : les molécules de la famille Ext n'ont aucune séquence associée à une activité biochimique connue [4], et si nous avons pu montrer que *ttv* codait pour une protéine de type II ancrée à la membrane [3], et qu'elle est présente dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, en revanche elle ne se localise ni avec Hh ni avec son récepteur *Ptc*, excluant une interaction directe avec ces protéines [6]. La fonction biochimique des molécules de la famille Ext a été découverte de manière fortuite. McCormick *et al.* ont identifié le gène *Ext-1* en recherchant des gènes requis pour la synthèse des héparanes sulfates (HS) [7]. Les HS sont des chaînes linéaires osidiques sulfatées constituées de l'enchaînement d'un

di-holoside contenant une hexoamine (la glucosamine) et un autre ose (l'acide glucuronique ou l'acide iduronique). Ces chaînes sont attachées par lien covalent à une chaîne polypeptidique au niveau de sérines par l'intermédiaire d'un tétra-oside particulier. L'ensemble protéine-chaîne osidique est nommé « protéoglycane à héparanes sulfates » (PGHS) (pour revue voir [8-9]). Au cours de la synthèse des PGHS, les molécules Ext auraient une activité glycosyltransférase nécessaire à l'assemblage des di-holosides [11]. En utilisant le mutant *ttv*, nous avons tout d'abord cherché à montrer que, chez la drosophile, les gènes de la famille Ext étaient requis pour la synthèse des HS. Les chaînes HS des PGHS peuvent être détachées de la chaîne polypeptidique par des héparanases. Ces coupures démasquent des épitopes reconnus par l'anticorps monoclonal 3G10. Chez les embryons mutants pour le gène *ttv* (embryons *ttv*), la digestion par une héparanase ne révèle aucune coloration après action de l'anticorps 3G10 [6], confirmant que Ttv semble bien jouer un rôle dans la synthèse de PGHS chez la drosophile. Dans l'embryon de drosophile, le gène *hh* est exprimé dans chaque segment de l'embryon, mais dans un petit groupe de cellules seulement. En revanche, la protéine, elle, est détectée non seulement dans les cellules exprimant *hh*, mais aussi dans les cellules adjacentes (*figure 1C* et *1E*). Dans les mutants *ttv*, la protéine Hh est présente exclusivement dans les cellules exprimant le gène *hh* (*figure 1D* et *1F*) [6]. On peut donc en conclure que la distribution de la protéine Hh est contrôlée par Ttv. Compte tenu du



**Figure 1. Phénotype des larves mutantes pour Tout-velu et rôle de la protéine Ttv dans la distribution de Hh.** **A.** Larve issue d'un embryon sauvage. La segmentation de la larve est clairement reconnaissable par l'alternance de zones recouvertes ou dépourvues de soies. **B.** Larve issue d'un embryon dont les contributions maternelle et paternelle du gène *ttv* sont éliminées. Le processus de segmentation est clairement affecté, seules des zones recouvertes de soies sont présentes. Les larves issues des embryons mutants pour Hh manifestent un phénotype similaire. **C.** Distribution de la protéine Hh chez l'embryon sauvage. **D.** Distribution de la protéine Hh dans un embryon *ttv*. **E.** Au cours de l'embryogenèse, Hh est exprimé dans les cellules postérieures du segment (noyaux roses) et adresse un message aux cellules antérieures (noyaux bistres) pour maintenir l'expression de *wingless*. La protéine Hh (cercles rouges) est distribuée de part et d'autre des cellules exprimant Hh. **F.** Dans les embryons *ttv*, la protéine Hh se distribue uniquement dans les cellules exprimant le gène *hh*, la signalisation aux cellules adjacentes antérieures n'a pas lieu, le processus de segmentation est donc affecté.

rôle de Ttv dans la synthèse des PGHS et des données antérieures montrant que Hh se lie à l'héparine, un glycosaminoglycane proche des héparanes sulfates, il est probable que Hh se lie directement aux chaînes HS des PGHS (*m/s* 1999, n° 15, p. 1325).

Comment les PGHS contrôlent-ils la distribution de la protéine Hh ? Une explication simple serait que la fixation des Hh aux chaînes HS du protéoglycane entraîne une concentration plus élevée de Hh à proximité de la membrane, favorisant la présentation à son récepteur Ptc. Cette étude chez l'embryon confirme en outre les données que nous avons précédemment obtenues montrant que la diffusion de Hh dans des cellules adjacentes requiert le gène *ttv* [3].

Les PGHS sont de très abondantes molécules qui règlent des fonctions très diverses allant de la résistance aux forces mécaniques à des fonctions cellulaires telles que l'adhérence, la prolifération ou la différenciation [9]. Cette diversité fonctionnelle repose sur des possibilités importantes de modifications des chaînes osidiques au cours de leur synthèse. L'étude de la fonction de ces molécules dans le cadre de la transduction des signaux extracellulaires avait cantonné ces molécules à des rôles peu spécifiques de co-récepteur pour de nombreux facteurs sécrétés. Dans les embryons *ttv*, nous avons montré que la distribution du facteur sécrété Wg, molécule de la famille des proto-oncogènes Wnts, est normale. La transduction du signal Wg, ou du signal FGF (*fibroblast growth factor*), n'est pas affectée dans ces mêmes embryons [6]. En revanche, ces deux voies de signalisation sont affectées lorsque la synthèse des PGHS est complètement abolie chez les mutants [11]. Il semble donc que Ttv soit requis de manière spécifique pour le contrôle de la distribution de Hh. Cette spécificité de Ttv à l'égard de Hh peut être de nature quantitative ou qualitative, c'est-à-dire que soit un seuil de concentration minimal de HS, soit un HS particulier est nécessaire. Nous avons cloné récemment un autre membre de la famille des gènes *Ext* chez la drosophile, nommé *D-Ext2* en raison de son homologie plus marquée avec le gène humain *Ext-2* [10]. Ce gène, exprimé de façon ubiquitaire, pourrait être responsable de la synthèse des PGHS nécessaires aux voies de signalisation des protéines Wg et FGF en l'absence de Ttv. Bien que, chez la drosophile, l'expression des gènes *ttv* ou *D-Ext2* soit ubiquitaire, il est probable que la régionalisation de l'expression de ces gènes chez les vertébrés puisse constituer un niveau important de régulation de l'activité des facteurs sécrétés.

La priorité est maintenant d'identifier le protéoglycane qui contrôle la distribution de la protéine Hh. Trois protéoglycanes ont été caractérisés chez la drosophile : Syndecan qui est apparenté à la famille des syndicanes, protéoglycanes transmembranaires,

Dally et Glycan K qui sont apparentés à la famille des glycanes, protéoglycane ancrés dans la membrane par une liaison glycosylphosphatidylinositol [8]. Des mutations entraînant une perte de fonction existent dans les gènes codant pour Syndecan et Dally. Il est donc désormais possible d'analyser la fonction de ces molécules dans le contrôle de la distribution de la molécule Hh.

1. Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP. The world according to hedgehog. *Trends Genet* 1997; 13: 14-21.  
 2. Ingham PW. The patched gene in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 88-94.  
 3. Bellaïche Y, The I, Perrimon N. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 1998; 394: 85-8.

4. Ahn J, Ludecke HJ, Lindow S, et al. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* 1995; 11: 137-43.  
 5. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273: 613-22.  
 6. The I, Bellaïche Y, Perrimon N. Hedgehog movement is regulated through tout-velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol Cell* 1999; 4: 633-9.  
 7. McCormick C, Leduc Y, Martindale D, et al. The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet* 1998; 19: 158-61.  
 8. Bernfield M, Gste M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 729-77.  
 9. Praillet C, Grimaud, JA, Lortat-Jacob H. Les protéoglycane: rôles en pathologie. *Med Sci* 1998; 14: 421-8.  
 10. Lind T, Tufaro F, McCormick C, Lindahl U, Lidholt K. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem* 1998; 273: 26265-8.

11. Hacker U, Lin X, Perrimon N. The Drosophila sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development* 1997; 124: 3565-73.

### Yohanns Bellaïche

Équipe ATIPE URA 1857, École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

### Inge The Norbert Perrimon

Department of Genetics, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, Massachusetts 02115, États-Unis.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **P63 indispensable au développement de l'ectoderme et des membres.** Indépendamment des gènes *HOX* dont le rôle dans le développement des membres n'est plus à démontrer [1, 2] (*m/s* 1994, n° 2, p. 145-8), de très nombreux gènes sont impliqués dans les ectrodactylies, anomalies qui recouvrent une grande variété de défauts de développement des doigts. Quand l'atteinte est médiane, elle a pour conséquence une malformation dite « en pince de homard » ou mains et pieds fendus (*split hand/split foot malformation* ou SHFM) pour lesquels trois locus ont déjà été identifiés en 7q21, Xq26 et 10q24. Souvent l'ectrodactylie est associée à d'autres anomalies. Dans les syndromes EEC (*ectrodactyly, ectodermal dysplasia, facial clefts*), par exemple, viennent s'ajouter dysplasie ectodermique et fente labiale. Chez une grande famille hollandaise, un syndrome cliniquement très proche des syndromes EEC, mais avec une hypoplasie/aplasie des mamelons et des glandes mammaires, vient d'être récemment décrit. Il a été appelé *limb-mammary syndrome* (LMS) [3]. Comme celui de certains cas familiaux de EEC (EEC3), son locus est

situé en 3q27. Dans cette région, le gène *SOX2*, qui aurait fait un excellent candidat (*m/s* 1993, n° 11, p. 1247-8), fut rapidement exclu. Après avoir délimité de façon plus étroite la région candidate, les auteurs eurent la surprise de constater que *p63*, un homologue de *p53*, était en cause dans neuf cas de EEC3 [4]. Les mutations faux-sens affectent le domaine de liaison à l'ADN (exon 5 à 8), dans une région correspondant pour *p53* à un point chaud de mutation dans les tumeurs humaines. Dans un seul cas, une mutation dans l'exon 13 avec rupture du cadre de lecture devrait entraîner une protéine tronquée pour l'isotype  $\alpha$ , en laissant intacts les isotypes  $\beta$  et  $\gamma$ . Dans la famille avec LMS, aucune mutation n'a encore été trouvée pour l'instant mais tous les exons n'ont pu être explorés et il y a tout lieu de supposer que le même gène est en cause. En effet, le gène *p63* est abondamment exprimé dans les cellules basales des couches épithéliales de la peau. En outre, son invalidation chez la souris aboutit à un phénotype très voisin [5, 6]: les souris *p63*<sup>-/-</sup> ont un trouble du développement de l'épiderme, des phanères, une absence de glandes

salivaires, lacrymales et mammaires, une hypoplasie de la mandibule ainsi que des troubles du développement des pattes antérieures et postérieures. Chez l'homme, dans les EEC3 et la famille de LMS, la transmission est autosomique dominante et les mutations observées sont à l'état hétérozygote. Concernant leurs conséquences, s'agit-il d'une haplo-insuffisance ou ne serait-ce pas plutôt par effet dominant négatif ou gain de fonction? Il est encore trop tôt pour conclure mais on peut déjà affirmer que *p63* intervient chez l'embryon dans le développement et le maintien de la crête apicale ectodermique où se produisent les interactions épithélium-mésenchyme nécessaires à la morphogenèse des membres.

[1. Renucci A, et al. *Med Sci* 1993; 9: 157-64.]  
 [2. Duboule D, Sordino P. *Med Sci* 1996; 12: 147-54.]  
 [3. Van Bokhoven H, et al. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 538-46.]  
 [4. Celli J, et al. *Cell* 1999; 99: 143-53.]  
 [5. Mills AA, et al. *Nature* 1999; 398: 708-13.]  
 [6. Yang A, et al. *Nature* 1999; 398: 714-8.]