

La voie de signalisation Wingless chez la drosophile

Yohanns Bellaïche
Norbert Perrimon

Les proto-oncogènes sécrétés jouent un rôle essentiel dans les processus de communication entre les différentes cellules d'un organisme multicellulaire. Cette communication est importante au cours du développement embryonnaire où la position relative des cellules détermine en grande partie leur devenir. Elle l'est aussi dans l'oncogenèse et ces molécules sécrétées sont souvent impliquées dans les phénomènes prolifératifs. L'exemple de Wingless, protéine de la famille des glycoprotéines Wnt, est représentatif des progrès accomplis dans la détermination des voies de transmission des signaux grâce à la double approche, génétique et biochimie. Chez la drosophile, les protéines Dishevelled, Zeste-white3 et Armadillo agissent séquentiellement, aboutissant à la prolifération cellulaire. Cette voie de signalisation a une correspondance chez les mammifères, la voie de Wnt1 ; l'analogue de la kinase Zeste-white3 est la kinase GSK3, l'analogue d'Armadillo est la β -caténine. Celle-ci est associée au domaine cytoplasmique des cadhérines, impliquées dans l'adhérence cellulaire. On a proposé très récemment que le récepteur de Wingless serait un membre de la famille Frizzled, des molécules à sept passages membranaires.

Les proto-oncogènes ont été initialement décrits comme des facteurs contrôlant la prolifération cellulaire. Au cours des dix dernières années, l'étude de leur fonction au cours du développement embryonnaire a mis en valeur leur rôle central dans les processus de spécification et de différenciation cellulaires. En outre, un nombre important de ces proto-oncogènes codent pour des facteurs sécrétés tels que EGF, FGF, TGF. Un champ important d'investigation s'est

donc ouvert afin de comprendre les modalités de la transduction du signal émis à la membrane par ces facteurs. La caractérisation des membres de la famille Wnt est un des exemples les plus démonstratifs de ce scénario. En 1982, le premier membre de la famille des glycoprotéines Wnt, Int-1, fut isolé comme le produit d'un proto-oncogène capable de stimuler la prolifération de cellules de souris en culture. Un nombre important d'analogues fut alors identifié dans l'ensemble du règne animal. L'analyse

ADRESSE

Y. Bellaïche : étudiant en thèse à l'université Paris 6. N. Perrimon : professeur de génétique à l'université d'Harvard et associate investigator de l'Institut médical Howard Hugues. Department of Genetics, Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, États-Unis.

RÉFÉRENCES

1. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 1987; 50: 649-57.
2. Nusse R, Varmus HE. *Wnt* genes. *Cell* 1992; 69: 1073-87.
3. Siegfried E, Perrimon N. *Drosophila* wingless: a paradigm for the function and mechanism of Wnt signaling. *BioEssays* 1994; 16: 395-404.
4. Baker NE. Embryonic and imaginal requirements for *wingless*, a segment-polarity gene in *Drosophila*. *Dev Biol* 1988; 125: 96-108.
5. Ingham PW, Martinez Arias A. Boundaries and fields in early embryos. *Cell* 1992; 68: 221-35.
6. DiNardo S, Sher E, Heemskerk-Jongens J, Kassis JA, O'Farrell PH. Two-tiered regulation of spatially patterned *engrailed* gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Nature* 1988; 332: 604-9.
7. Martinez Arias A, Baker N, Ingham PW. Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. *Development* 1988; 103: 153-70.
8. Heemskerk J, DiNardo S, Kostriken R, O'Farrell PH. Multiple modes of *engrailed* regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 1991; 352: 404-10.
9. van den Heuvel M, Nusse R, Johnston P, Lawrence PA. Distribution of the *wingless* gene product in *Drosophila* embryos: a protein involved in cell-cell communication. *Cell* 1989; 59: 739-49.
10. Gonzalez F, Swales L, Bejsovec A, Skaer H, Martinez Arias A. Secretion and movement of the *wingless* protein in the epidermis of the *Drosophila* embryo. *Mec Dev* 1991; 35: 43-54.
11. Cumberledge S, Krasnow MA. Intercellular signalling in *Drosophila* segment formation reconstructed in vitro. *Nature* 1993; 363: 549-52.
12. Bejsovec A, Martinez Arias A. Roles of *wingless* in patterning the larval epidermis of *Drosophila*. *Development* 1991; 113: 471-85.
13. Dougan S, DiNardo S. *Drosophila* wingless generates cell type diversity among *engrailed* expressing cells. *Nature* 1992; 360: 347-50.
14. Perrimon N, Engstrom L, Mahowald AP. Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X-chromosome. *Genetics* 1989; 121: 333-52.
15. Chou TB, Perrimon N. Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 1992; 131: 643-53.

Wg et la segmentation de l'embryon de drosophile

de leurs séquences primaires révélait que ces gènes codent pour des protéines sécrétées de 350 à 380 acides aminés. Ces protéines possèdent un ou plusieurs sites de glycosylation et jusqu'à 24 cystéines dont la distribution est conservée entre les différents membres de la famille. En 1987, le gène *wingless* (*wg*) de la drosophile fut cloné. Il codait pour l'orthologue de *Int-1* [1] (la désignation Wnt est issue de Wg et Int). Cette découverte marqua le début de l'étude génétique de la fonction des protéines Wnt au cours du développement. Elle fut suivie de nombreuses études chez la souris, le xénope et d'autres modèles animaux. L'ensemble de ces études a souligné le rôle essentiel des membres de la famille Wnt dans un très grand nombre de processus embryonnaires : spécification des axes, différenciation et prolifération d'un grand nombre de tissus et d'organes [2, 3]. L'objet de cette revue n'est pas tant de souligner les différents processus embryonnaires au cours desquels les protéines Wnt sont impliquées, mais de décrire les mécanismes et les molécules impliquées dans la voie de transmission du signal Wnt. Les mécanismes de la transmission de ce signal vers le noyau sont restés longtemps obscurs contrairement à ceux d'un nombre important de facteurs sécrétés, initialement découverts comme des produits de proto-oncogènes. L'association des protéines Wnt à la matrice extracellulaire les ont rendues difficiles à isoler sous une forme soluble active. Cela a retardé la caractérisation de récepteurs potentiels qui fourniraient un point d'entrée pour découvrir certains partenaires impliqués dans la transmission du signal émis par les Wnt. Toutefois, en utilisant Wg comme un paradigme pour l'étude des voies de signalisation des protéines Wnt, une approche génétique a permis d'identifier certains partenaires impliqués dans cette voie de transmission du signal chez la drosophile. Nous décrivons tout d'abord le processus embryonnaire utilisé pour identifier des mutations modifiant potentiellement la transmission du signal émis. Puis nous verrons que la caractérisation de ces mutations a permis d'établir un modèle de signalisation apparemment conservé au cours de l'évolution. Ce modèle a été récemment complété par la caractérisation de récepteurs potentiels des protéines Wnt.

Le premier allèle du gène *wg*, *wg^l*, fut initialement isolé par sa propriété de provoquer, lors de la métamorphose adulte, une perte de l'aile associée à une duplication symétrique du thorax [4]. L'analyse d'allèles, supprimant toute activité du gène *wg*, a, par la suite, révélé que *wg* est important pour un ensemble de processus embryonnaires : segmentation de l'épiderme, formation de l'intestin, détermination de certaines populations de neuroblastes, développement et prolifération des tubules de Malpighi. Le gène *wg* est nécessaire au cours du développement larvaire pour la détermination des structures ventrales des pattes et, bien sûr, pour le développement de l'aile [3]. Le rôle de *wg* au cours de la segmentation de l'embryon de drosophile a été un atout essentiel pour caractériser des mutations affectant la transmission du signal émis par Wg. Au cours du développement de l'embryon de drosophile, l'épiderme se divise en 14 segments. Ceux-ci sont clairement démarqués chez la larve par l'alternance régulière de zones de cuticule nue et de zones décorées d'excroissances cuticulaires sécrétées par les cellules épidermiques sous-jacentes (*figures 1A et 3*). Les embryons homozygotes pour le gène mutant *wg* (embryons *wg*) manifestent une absence totale de zones de cuticule nue ainsi qu'une perte de variété et de polarité des excroissances cuticulaires (*figure 1B*). Ce phénotype, dit de « polarité segmentaire » [5], a deux origines distinctes : (1) la perte d'expression du gène *engrailed* (*en*); (2) le rôle de *wg* dans la détermination des zones de cuticules nues. Le facteur à homéodomaine En est important pour la segmentation ; il marque les cellules postérieures de chaque segment, permettant leur délimitation. Le gène *wg* est exprimé dans une bande de cellules directement adjacentes et antérieures aux cellules exprimant *en* (*figures 2A et 3*). Chez les embryons *wg*, l'expression de *en* débute correctement mais disparaît peu après [6] (*figure 2C*); la position des différents segments n'est pas déterminée et le processus de segmentation s'en trouve compromis [6-8]. Deux arguments indiquent que la protéine Wg

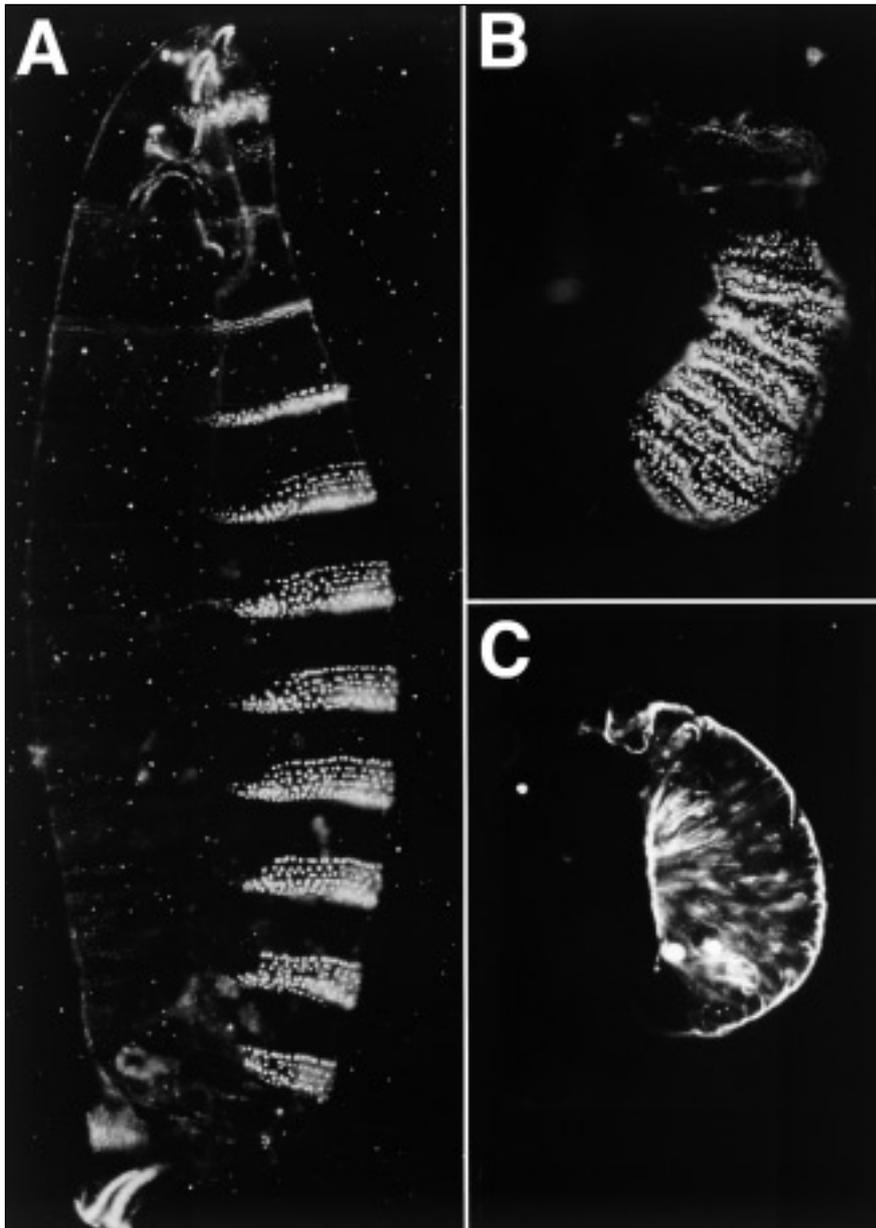


Figure 1. **Cuticules des larves sauvages et mutantes *wg* et *zw3*.** **A: Cuticule de la larve sauvage.** L'épiderme est divisé en 14 segments, clairement identifiés par l'alternance de zones de cuticule nue et de zones décorées d'excroissances cuticulaires. **B: Cuticule d'une larve homozygote pour la mutation *wg*.** On note l'absence totale de zone de cuticule nue, de même que la perte de variété et de polarité des excroissances cuticulaires. Les larves issues d'embryons *porc*, *dsh* et *arm* ont un phénotype similaire. **C: Cuticule d'une larve issue d'un embryon *zw3*.** L'épiderme de l'embryon se différencie uniquement en zones de cuticule nue.

maintient directement la synthèse de En dans les cellules adjacentes: (1) la protéine sécrétée Wg est détectée dans les vésicules d'internalisation des cellules exprimant *en* [9, 10]; (2) lorsque les cellules exprimant *en* sont isolées en culture, elles maintiennent l'expression

de *en* si elles sont co-cultivées avec des cellules « naïves » exprimant *wg* [11]. Le gène *wg* est aussi important pour la détermination des zones de cuticule nue. En utilisant des allèles thermo-sensibles de *wg*, on a montré que l'expression de *en* devient par la

suite indépendante de *wg*; toutefois, en l'absence de ce dernier, les zones de cuticule nue de la larve ne sont pas déterminées [12, 13].

Recherche de mutants zygotiques létaux à effet maternel

Des mutations affectant la transmission du signal émis par Wg doivent, dans une première approximation, se manifester par des phénotypes similaires à ceux de la mutation *wg*. Le phénotype des larves issues d'embryons *wg* étant facile à visualiser, il a été utilisé pour identifier, parmi de larges collections de mutants, ceux affectant cette transmission. Toutefois des études exhaustives de mutants zygotiques létaux n'ont révélé aucune mutation induisant un phénotype semblable à celui des mutants *wg*. Cela suggère donc que les gènes requis pour la transduction du signal émis par Wg ont une fonction plus pléiotropique que *wg*, ou que la contribution maternelle de ces gènes compense leur perte de fonction zygotique au cours du développement embryonnaire. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, il est nécessaire d'analyser le phénotype d'embryons homozygotes pour la mutation dont la contribution maternelle de ce gène a été éliminée. De tels embryons peuvent être obtenus en analysant la progénie d'individus femelles mosaïques dont la lignée germinale est homozygote pour la mutation tandis que son soma est, quant à lui, hétérozygote (figure 4). Jusqu'à très récemment, la réalisation de tels individus mosaïques était limitée au chromosome X [14-16].

Au cours d'une recherche systématique de mutations zygotiques létales à effet maternel sur ce chromosome, quatre mutations se manifestant par un phénotype similaire ou opposé à celui d'une perte de fonction du gène *wg* ont été identifiées: *porcupine* (*porc*), *dishevelled* (*dsh*), *armadillo* (*arm*) et *zeste white-3* ou *shaggy* (*zw3*) [14]. Ces mutations ont pu être classées en deux groupes: d'une part *porc*, requis pour l'émission du signal Wg et, d'autre part, *dsh*, *zw3* et *arm* requis pour la transmission proprement dite du signal émis par Wg.

RÉFÉRENCES

16. Chou TB, Noll E, Perrimon N. Autosomal *P[ovo^{D1}]* dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* 1993; 119: 1359-69.
17. Martinez Arias A. Pathways of cell communication during development. Signalling and epistasis. *Trends Genet* 1994; 10: 219-22.
18. Siegfried E, Wilder EL, Perrimon N. Components of wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 1994; 367: 76-80.
19. Klingensmith J, Nusse R, Perrimon N. The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev* 1994; 8: 118-30.
20. Peifer M, Rauskolb C, Williams M, Riggleman B, Wieschaus E. The segment polarity gene *armadillo* interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation. *Development* 1991; 111: 1029-43.
21. Doyle D, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* 1996; 85: 1067-76.
22. Yanagawa S, van Leeuwen F, Wodarz A, Klingensmith J, Nusse R. The Dishevelled protein is modified by Wingless signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* 1995; 9: 1087-97.
23. Peifer M, Wieschaus E. The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell* 1990; 63: 1167-78.
24. Peifer M, Orsulic S, Pai LM, Loureiro J. A model system for cell adhesion and signal transduction in *Drosophila*. *Development* 1993; Supplement: 163-76.
25. Siegfried E, Chou TB, Perrimon N. *wingless* signaling acts through *zeste-white 3*, the *Drosophila* homolog of *glycogen synthase kinase-3*, to regulate *engrailed* and establish cell fate. *Cell* 1992; 71: 1167-79.
26. Ruel L, Pantescio V, Lutz Y, Simpson P, Bourouis M. Functional significance of a family of protein kinases encoded at the shaggy locus in *Drosophila*. *EMBO J* 1993; 12: 1657-69.
27. Noordermeer J, Klingensmith J, Perrimon N, Nusse R. *dishevelled* and *armadillo* act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature* 1994; 367: 80-3.
28. Kadowaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N. The segment polarity Gene *porcupine* encodes a putative multi-transmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* 1997 (sous presse).
29. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimeland D, Moon RT. The axis-inducing activity, atability, and subcellular distribution of β -catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996; 10: 1443-54.

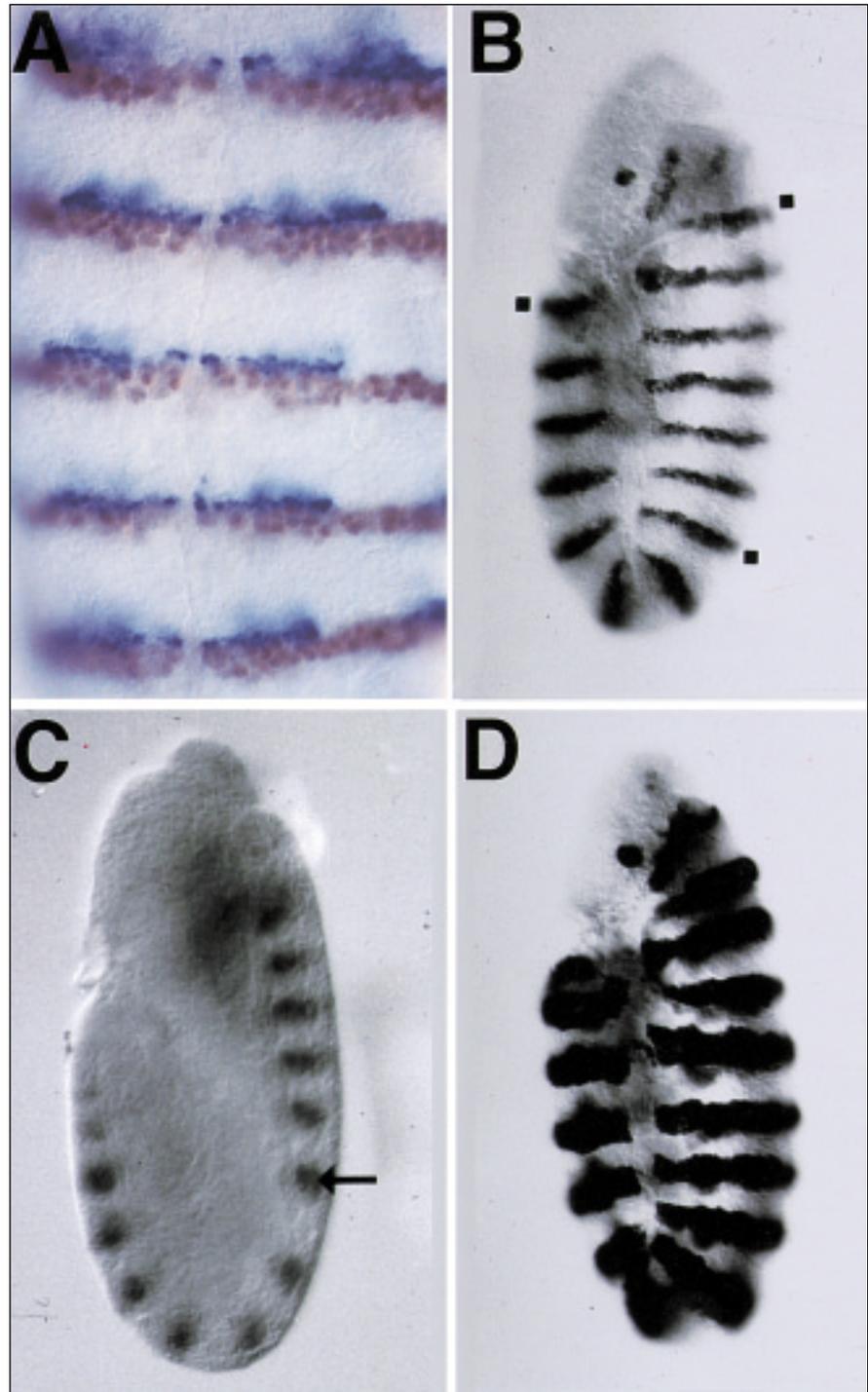


Figure 2. **Expression de *wg* et *en* chez différents embryons 9 heures après fécondation.** **A :** Détail de la localisation des transcrits des gènes *wg* (wingless) (bleu) et *en* (*engrailed*) (brun) : le facteur *En* marque les cellules postérieures de chaque segment, *Wg* est synthétisé dans les cellules qui leur sont immédiatement adjacentes et antérieures. **B :** Expression de *en* chez l'embryon sauvage. **C :** L'expression de *En* ne se maintient pas dans l'épiderme chez les embryons *wg*. La flèche indique l'expression dans le système nerveux qui est indépendante de *wg*. **D :** Expression de *En* chez l'embryon *zw3*.

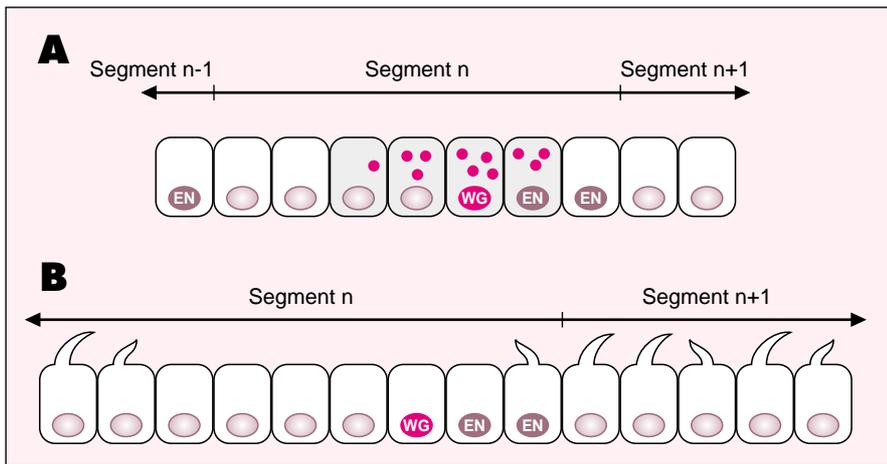


Figure 3. **Structure du segment** (pour plus de précision voir [44]). **A**: Segment 9 heures après fécondation. Sphères noires: vésicules d'internalisation de Wg. Cellules vertes: cellules accumulant Arm. **B**: Segment de la larve.

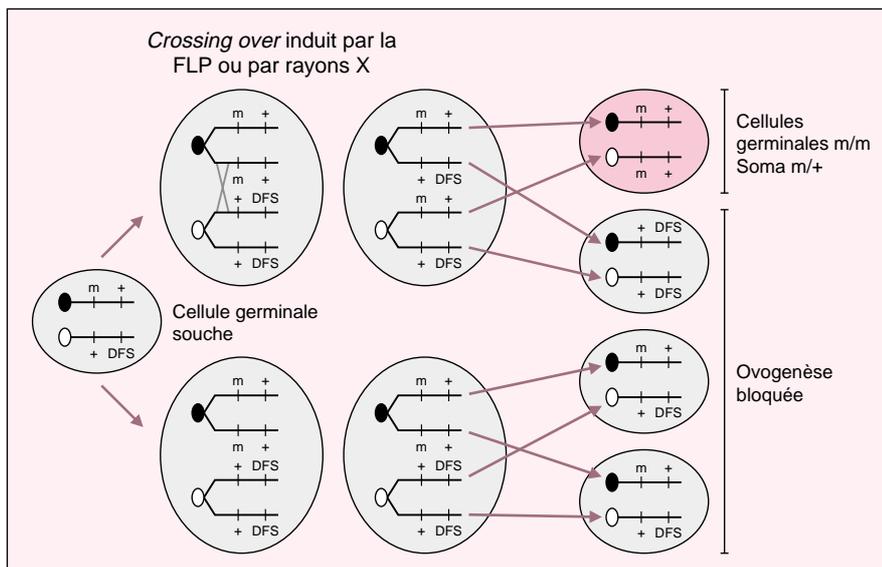


Figure 4. **Méthode utilisée pour produire des individus mosaïques pour les gènes *dsh*, *zw3*, *arm* ou *porc***. *DFS* est une mutation dominante qui bloque l'ovogenèse. Les cellules germinales souches hétérozygotes pour la mutation *m* et *DFS* ne donnent pas d'œuf. En induisant un crossing-over entre les chromatides, soit par rayons X, soit grâce à une recombinase (*FLP*), seules les cellules germinales homozygotes pour la mutation *m* se développeront. Elles produiront ainsi des œufs dépourvus de la contribution maternelle du gène associé à la mutation *m*.

Porcupine et sécrétion de Wg [17, 18]

Des embryons hémizygotés* pour la mutation *porc* et dépourvus de la contribution maternelle de ce gène

* Hémizygoté: mutation sur le chromosome X ou sur une délétion.

(embryons *porc*) ont un phénotype semblable à celui des embryons *wg*. L'analyse de clones mutants pour *porc* révèle que *porc* agit à l'intérieur d'un ensemble de cellules («cellules non autonomes»): des cellules mutantes pour *porc* peuvent répondre au signal émis par Wg dans la mesure où elles sont entourées par un groupe de cellules normales. La pro-

téine *Porc* ne semble donc pas impliqué dans la réception du signal transmis par Wg mais plutôt dans l'émission de ce signal.

Différentes données indiquent que *porc* participe au processus de sécrétion de Wg: (1) Chez les embryons *porc*, la protéine Wg s'accumule dans les cellules exprimant le gène *wg* et ne semble pas être sécrétée (figure 5); (2) *porc* code pour une grande protéine de 551 acides aminés, extrêmement hydrophobe, possédant au moins 7 domaines transmembranaires et apparemment localisée dans le réticulum endoplasmique; (3) l'étude de l'expression de *wg* dans des cellules transfectées avec *porc* révèle que la protéine Wg apparaît mieux glycosylée et se distribue à la membrane cellulaire.

Enfin, la distribution d'autres facteurs sécrétés tels que Dpp (Decapentaplegic) ou Hh (Hedgehog) n'est pas affectée par la mutation *porc*; la sécrétion de la protéine Wg requiert donc, outre la machinerie classique de sécrétion, l'aide de protéines spécifiques telle que *porc*. Des analogues de *porc* ont été identifiés chez l'homme et le xénope suggérant que les modalités de sécrétion des protéines Wnt ont été conservées elles aussi.

En aval du récepteur Wg

Les mutations *dsh* et *arm* entraînent des manifestations localisées à la cellule atteinte («cellules autonomes») [19, 20]. Des cellules mutantes pour ces locus sont incapables de transmettre le signal émis par Wg. Les larves issues d'embryons *dsh* ou *arm* ont un phénotype similaire à celui de *wg*, c'est-à-dire une absence de zones de cuticule nue ainsi qu'une perte d'orientation des excroissances cuticulaires. Chez ces embryons, l'expression de *en* débute correctement mais, comme chez les embryons *wg*, elle ne se maintient pas [19]. Le clonage de *dsh* révèle que ce gène code pour une nouvelle protéine, conservée au cours de l'évolution et qui possède un domaine PDZ [19]. Le domaine PDZ est présent dans un ensemble de protéines cytoplasmiques associées à la membrane, telles que Disc-large, PSD-95 et Lin-7. Récemment, les domaines PDZ ont été impliqués dans la localisation et l'association de

RÉFÉRENCES

30. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3 β to APC- β -Catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272: 1023-6.
31. Romagnolo B. APC: de nouveaux partenaires, de nouveaux indices. *Med Sci* 1996; 12: 1109-10.
32. van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, Clevers HC. SoX-4, an SRY-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J* 1993; 12: 3847-54.
33. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. Xtcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996; 86: 391-9.
34. Bhanot P, Brink M, Samos HC, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996; 382: 225-30.
35. Adler PN. The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *BioEssays* 1992; 14: 735-41.
36. Vinson CR, Conover S, Adler PN. A *Drosophila* tissue polarity gene encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 1989; 338: 263-4.
37. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M. Notch signaling. *Science* 1995; 268: 225-32.
38. Schweisguth F, Israël A. Signalisation intercellulaire par le récepteur Notch: conservation de la drosophilie aux mammifères. *Med Sci* 1996; 12: 155-63.
39. Couso JP, Martinez Arias A. *Notch* is required for *wingless* signalling in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 1994; 79: 259-72.
40. Hing HK, Sun X, Artavanis-Tsakonas S. Modulation of wingless signaling by Notch in *Drosophila*. *Mec Dev* 1994; 47: 261-70.
41. Axelrod JD, Matsuno K, Manoukian AS, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N. Notch interacts with dishevelled to modify wingless signaling. *Science* 1995; 271: 1826-32.
42. Couso JP, Bishop S, Martinez Arias A. The *wingless* signalling pathway and the development of the wing margin in *Drosophila*. *Development* 1994; 120: 621-36.
43. Phillips RG, Whittle JRS. *wingless* expression mediates determination of peripheral nervous system elements in late stages of *Drosophila* wing disc development. *Development* 1993; 118: 427-38.
44. Martinez Arias A. Development and patterning of the larval epidermis of *Drosophila*. In: Michael Bate M, Martinez Arias A, eds. *The development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993: 517-608.

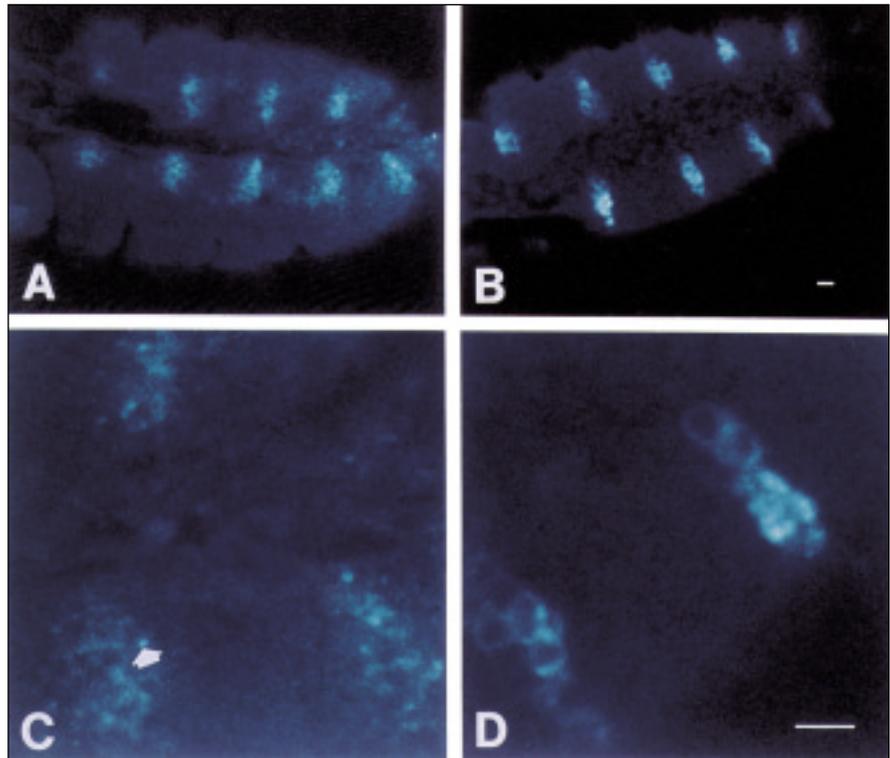


Figure 5. Localisation de la protéine Wg chez l'embryon sauvage et chez l'embryon porc chez lequel le gène porc est muté. **A**: Embryon sauvage âgé de 9 heures. La protéine Wg se distribue sur 4 à 5 cellules de part et d'autre de cellules exprimant *wg*. **B**: Embryon porc: la protéine Wg est confinée dans les cellules exprimant *wg* et est localisée à la membrane. **C** et **D**. Détails, respectivement de **A** et **B**.

molécules membranaires telles que les canaux K⁺ ou NDMA des synapses ou le récepteur de l'EGF (pour revue [21]). En réponse au signal émis par Wg, Dsh est hyperphosphorylé et une fraction du pool cytoplasmique se relocalise à la membrane [22]. De son côté, *arm* code pour l'analogue de la protéine β -caténine [23]. Celle-ci est associée, avec les molécules α -caténine, au domaine cytoplasmique des cadhérines. Ces dernières sont nécessaires à l'adhérence cellulaire et présentes dans les jonctions adhérentes. La distribution de la protéine Arm est modulée au cours de l'embryogenèse. Les cellules soumises au signal émis par Wg accumulent la protéine Arm. Cette accumulation semble être le résultat d'une modification post-traductionnelle de la protéine, accroissant sa stabilité et conduisant à une augmentation de sa concentration intracellulaire [24]. La mutation *zw3* est associée à un phénotype opposé à celui de *wg*: l'épiderme de l'embryon se différen-

cie uniquement en zones de cuticule nue. L'expression de *en* chez ces mutants est correctement activée, mais s'étend à un nombre plus important de cellules (figures 1C et 2D) [25]. En outre, elle est indépendante de *wg*, puisque son profil est identique chez les embryons *zw3* et les embryons *zw3* et *wg*. L'activité du gène *zw3* s'oppose donc à l'activité de *wg*. Le gène *zw3* code pour une protéine kinase de type sérine/thréonine kinase qui est analogue aux protéines GSK β -3 de mammifères. Ces protéines ont une activité kinase constitutive qui peut être contrôlée par la phosphorylation de certains résidus sérine [26]. La position de ces différents gènes dans le système de transduction Wg a été déterminée en examinant les relations épistatiques entre les gènes *dsh*, *arm* et *zw3*. Les embryons double-mutants *dsh zw3* ont un phénotype similaire à celui de *zw3*. *zw3* est donc épistatique à *dsh*, ce qui signifie que ce dernier fonctionne probablement

en amont de *zw3*. A l'opposé, les embryons double-mutants *arm zw3* ont un phénotype similaire à celui de *arm*, indiquant que celui-ci fonctionne en aval de *zw3* [18, 27].

Les relations épistatiques entre les gènes *dsh*, *zw3* et *arm* ainsi que les informations issues de leur clonage ont permis de construire un modèle pour décrire la transmission du signal Wg. Après fixation par un récepteur hypothétique de la protéine sécrétée Wg, l'activation de la protéine Dsh entraîne une diminution de l'activité de la protéine kinase Zw3. Cette diminution induit l'accumulation de la protéine Arm. Cette accumulation serait alors nécessaire pour maintenir l'expression du gène *en*. En l'absence de signal Wg, la kinase Zw3 réprime de façon constitutive l'accumulation d'Arm inhibant la voie de signalisation de Wg. Ce modèle étant fondé sur une étude épistatique des relations entre les différents partenaires de ce système, *dsh* pourrait contrôler directement ou indirectement l'activité de *zw3*. D'autre part, il n'est pas exclu que *dsh* fonctionne aussi en aval de *zw3* afin de s'opposer à son activité constitutive (pour une étude détaillée des relations épistatiques du système de transduction Wg voir revue [28]). Plus récemment, des études réalisées chez le xénope et en culture cellulaire sont venues compléter et confirmer ce modèle. Yost *et al.* [29] ont montré que la β -caténine était directement phosphorylée par GSK β -3. Cette phosphorylation réduit sévèrement la durée de vie de la protéine β -caténine. Rubinfeld *et al.* [30] ont de leur côté mis en évidence que GSK β -3 phosphoryle le gène *adenomatous polyposis coli* (APC), un proto-oncogène impliqué dans certains cancers du côlon. La forme phosphorylée de APC s'associe à la protéine β -caténine, et ce complexe pourrait être alors rapidement dégradé. En réduisant l'activité de GSK β -3, l'association entre APC et la protéine β -caténine serait supprimée, permettant l'accumulation de la protéine β -caténine [31].

Chez le xénope, la relation entre l'accumulation de la protéine β -caté-

nine et la transmission du signal émis par Wg a été comprise lors de la découverte de l'association entre le facteur XTcf-3 et la protéine β -caténine. XTcf-3 appartient à la famille des facteurs Lef-1 qui se fixent à l'ADN mais ne semblent pas être par eux-mêmes actifs sur la transcription [32]. L'accumulation de la protéine β -caténine conduit à la formation d'un complexe XTcf-3/ β -caténine qui se localise dans le noyau de la cellule où il est capable d'activer l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'une séquence reconnue par XTcf-3. De plus, l'expression de formes dominantes négatives de XTcf-3 se manifeste par des phénotypes opposés à ceux provoqués par l'expression ectopique de protéines Wnt chez le xénope. Les facteurs Lef-1 pourraient

donc être de nouveaux partenaires du système de transduction Wg [33]. L'étude génétique que nous venons de décrire a permis la caractérisation d'un ensemble d'éléments requis pour la transmission du signal émis par Wg. Par la suite, une étude biochimique a confirmé la validité du modèle proposé et a permis la caractérisation de nouveaux éléments (figure 6). Toutefois, un élément important restait à découvrir : le récepteur des molécules Wnt. Une approche différente a récemment permis sa caractérisation.

Dfz2, un candidat pour le récepteur Wg*

Bhanot *et al.* [34] ont identifié le gène *Dfz2* comme un récepteur potentiel de Wg. La protéine Dfz2

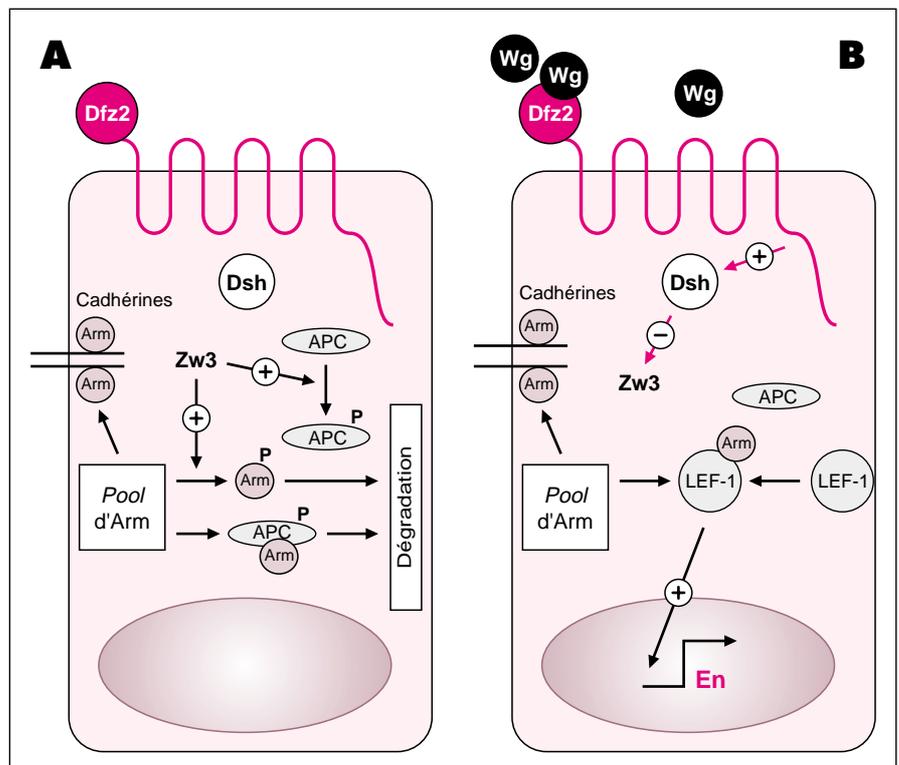


Figure 6. **Modèle de transduction du signal émis par Wg.** **A :** En l'absence de Wg, l'activité de la protéine kinase Zeste-white-3 (Zw) conduit à une dégradation de la protéine Armadillo (Arm). **B :** En présence de Wg, l'activation de la protéine Dishevelled (Dsh) inhibe l'activité kinase de Zw3; la protéine Arm pourrait alors interagir avec Lef-1. Les flèches rouges indiquent des interactions mises en évidence par la génétique. Les flèches noires indiquent des interactions physiques. Les analogues des gènes Lef-1 et APC n'ont pas été identifiés chez la drosophile. L'action du complexe Arm/Lef-1 sur le promoteur du gène *en* est purement hypothétique. Il est à noter que dans un contexte d'embryon différent, le système de transduction Wg peut contrôler l'expression d'autres gènes tels que *achaete-scute* et *vg*.

* Pour plus de détails sur les gènes frizzled, voir la mini-synthèse de Jean Deutsch et Denise Busson, page 222 de ce numéro.

fait partie de la famille des molécules Frizzled. Cette famille compte actuellement dix membres aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Le gène *frizzled* (*fz*) a été isolé en se fondant sur son effet sur la polarité tissulaire. Cette polarité se manifeste par l'orientation proximo-distale ou antéro-postérieure des poils couvrant le corps de la drosophile (pour revue [35]). Chez les mutants *fz*, cette polarité est fortement altérée et les poils pointent dans différentes directions. Le gène *fz* code pour une protéine à sept domaines transmembranaires apparentée à la famille des récepteurs dits serpentins qui sont souvent couplés à des protéines G [36]. La séquence primaire de la protéine Fz n'indique toutefois pas un tel couplage. Le gène *dsh* fut initialement isolé et nommé ainsi lors de la découverte de l'allèle *dsh'* qui manifeste un phénotype similaire à celui des mutants *fz*. La similitude entre ces phénotypes semblait se limiter à ce processus puisque la mutation *fz* n'est pas létale pour l'embryon. La récente découverte par Bhanot *et al.* [34] d'un analogue de *fz*, *Dfz2*, a conduit ces auteurs à analyser la relation entre les protéines Wg et Dfz2. Ils ont montré que Wg se fixe sur des cellules « naïves » quand elles sont transfectées avec le gène *Dfz2*, et que cette fixation s'accompagne d'une accumulation de la protéine Arm [34]. Ces données indiquent clairement que les membres de la famille *fz* sont des récepteurs des molécules Wnt *in vitro*. Toutefois, il faut attendre la caractérisation de mutations du gène *Dfz2* pour démontrer que Dfz2 est le récepteur de Wg *in vivo*. Le profil d'expression de *Dfz2* est en accord avec ce rôle potentiel de récepteur de Wg. Quelle relation existe-t-il entre *dsh* et *Dfz2*? En culture cellulaire, Dsh est hyperphosphorylée en réponse à la réception du signal Wg et se localise à la membrane. Dsh possédant un domaine PDZ, cette protéine pourrait interagir directement avec Dfz2 qui possède le motif consensus (X-S/T-V-COOH-) nécessaire pour s'associer aux domaines PDZ [21]. Dfz2 ne possédant pas de motif à activité kinase, la phosphorylation de Dsh pourrait être une conséquence de sa localisation membranaire.

Relation entre Wg et Notch

Au cours du développement, Wg influe sur le devenir de certaines populations cellulaires. Toutefois, ces populations répondent aussi à un ensemble d'autres signaux nécessaires à leur spécification. L'intégration des signaux émis par Wg et par le récepteur Notch (N) a été caractérisée au cours des dernières années. Notch est une grande protéine transmembranaire, dont le domaine extracellulaire contient 36 répétitions de type EGF, ainsi que trois domaines riches en cystéines. Le domaine intracellulaire possède six répétitions de type ankyrine. N est impliqué dans un nombre très important de décisions binaires au cours du développement. Deux protéines ont été clairement impliquées comme des ligands de N, Delta et Serrate (pour revues [37, 38]). De nombreuses observations génétiques suggèrent une interaction entre les signaux émis N et Wg [39, 40]. Toutefois, la segmentation de l'épiderme de drosophile n'est pas un bon modèle pour analyser les relations existant entre N et *wg*. En effet, N étant impliqué dans la décision binaire de différenciation en cellule épidermique ou neuroblaste au cours du développement embryonnaire, l'effet de la mutation N conduit à un très large excès de neuroblastes au détriment de l'épiderme et son effet sur la segmentation de ce dernier est donc difficile à interpréter. Afin de mieux comprendre les relations entre *wg* et N, Axelrod *et al.* [41] ont utilisé un autre système: la détermination des soies sensorielles de la bordure de l'aile. La bordure antérieure de l'aile est décorée par un ensemble de soies sensorielles organisées de façon stéréotypée. Ces cellules sensorielles sont déterminées au troisième stade larvaire, au cours du développement tardif du disque imaginal de l'aile [42]. Le rôle de Wg dans la détermination de ces précurseurs sensoriels est souligné par les observations suivantes [43]: (1) Le gène *wg* est exprimé au niveau de la future bordure de l'aile, au stade où ces cellules sont déterminées; (2) une réduction ou une augmentation de l'expression de *wg* à ce stade

conduit, respectivement, à une réduction ou à une augmentation du nombre de précurseurs; (3) Wg contrôle l'expression des gènes du complexe *achaete-scute* (*AS-C*) qui est nécessaire à la détermination des précurseurs neuronaux.

Axelrod *et al.* [41] ont sensibilisé le processus de détermination de ces cellules, en surexprimant le gène *dsh* (figure 7), ce qui a pour effet d'agrandir la zone où des précurseurs neuronaux se développent sur l'aile. Cette expansion paraît liée qualitativement à la quantité de Wg synthétisée par les cellules de la bordure de l'aile. Ainsi, l'activité du système de transduction Wg peut être mesurée par le degré d'expansion de la zone ou se différencient des précurseurs neuronaux. En réduisant l'activité de N, le nombre de précurseurs augmente. Réciproquement, l'expression de formes tronquées de N, constitutivement actives, réduit le nombre de précurseurs. Au cours de ce processus, *wg* et N semblent agir de façon antagoniste. En outre, Dsh interagit directement avec la partie carboxyterminale de N. L'ensemble de ces données ont conduit Axelrod *et al.* à proposer que les activités antagonistes du système de transduction Wg et N seraient relayées par la protéine Dsh dont l'activité serait réprimée par fixation à Notch. Toutefois, le mécanisme exact de cette répression n'est pas élucidé. En effet, le signal émis par N à la suite de son interaction avec Delta est transduit par une translocation nucléaire du facteur de transcription *Suppressor of Hairless* (Su(H)) [37, 38].

Les cellules de la bordure de l'aile sont donc soumises à deux signaux, un signal inducteur émis par Wg et un signal inhibiteur émis par N.

Conclusion

Les facteurs sécrétés jouent un rôle essentiel dans les processus de communication entre les différentes cellules d'un organisme multicellulaire. Cette communication est importante au cours du développement embryonnaire où la position relative des cellules détermine en grande partie leur devenir. Les glycoprotéines sécrétées de la famille Wnt sont les médiateurs de cette communication à de nombreuses étapes du développement.

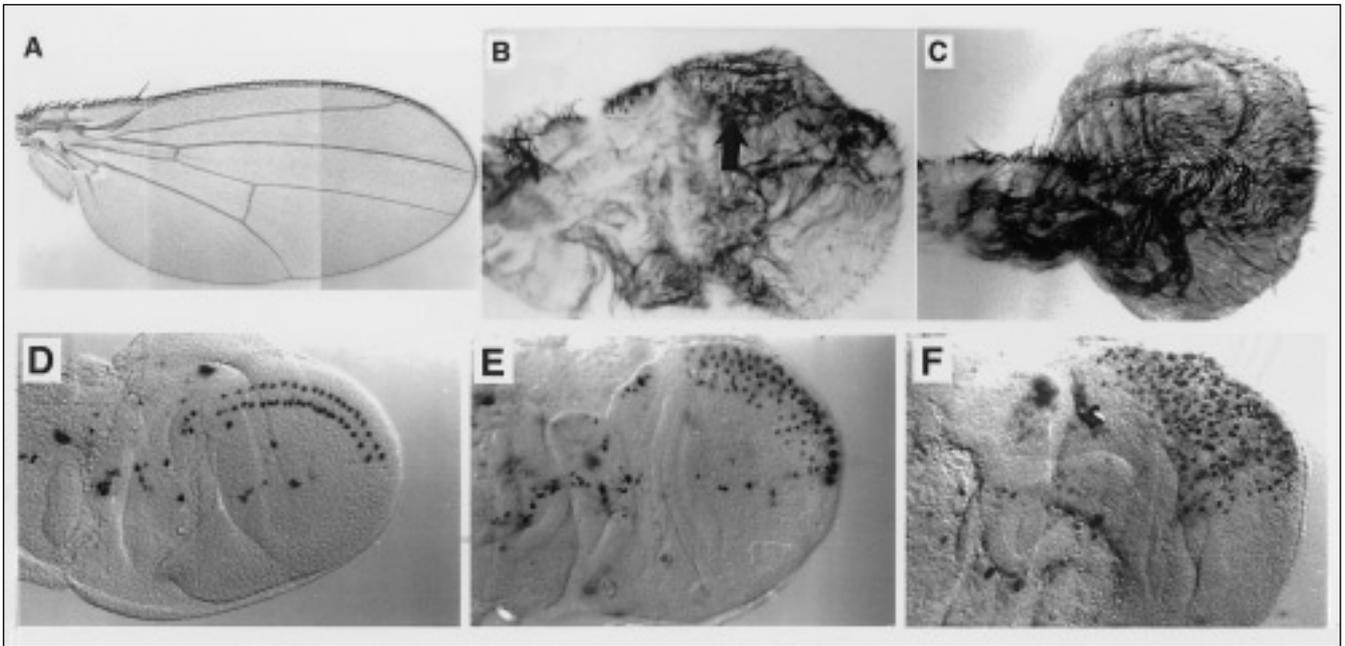


Figure 7. **A, B, C: Vue dorsale de l'aile de drosophile.** A: Aile sauvage. La bordure antérieure de l'aile est décorée de soies sensorielles. B: L'expression ectopique de dishevelled (*dsh*) accroît le nombre de soies. C: L'expression ectopique de *dsh* dans une mouche hétérozygote pour la mutation *Notch* induit un nombre de soies supérieur à celui observé lorsque l'expression ectopique de *dsh* est isolée. **D, E, F: Expression du marqueur A101 dans le disque imaginal de l'aile.** Les disques imaginaires sont les structures larvaires dont les apanages de l'adulte sont issus au cours de la métamorphose. Le marqueur A101 marque les cellules sensorielles précurseurs des soies sensorielles. D: aile sauvage. E: Expression ectopique de *dsh*; la surexpression de *dsh* a pour effet d'agrandir la zone où des précurseurs neuronaux se développent sur l'aile. F: Expression ectopique de *dsh* dans une larve hétérozygote pour la mutation *Notch*. En réduisant l'activité de *Notch*, le nombre des précurseurs augmente. Il est proposé que les activités antagonistes du système de transduction *Wg* et *N* seraient relayées par la protéine *Dsh* dont l'activité est réprimée par fixation à *Notch*.

En outre, un dérèglement de leurs fonctions est associé à certains cancers. Comprendre les mécanismes de transduction de ces signaux donne les moyens de décrire en termes moléculaires certaines étapes du développement. Un ensemble d'approches génétiques et moléculaires a permis d'établir un modèle de transduction de la voie de signalisation de la famille des Wnt (figure 6). Toutefois, un grand nombre de questions subsistent. Les modalités de transduction par les récepteurs de la famille Fz sont inconnues et le rôle de Dsh et sa relation avec GSK reste à découvrir. L'appartenance d'Arm à la famille des β -caténine indique que les membres de la famille Wnt pourraient contrôler directement certains processus d'adhérence cellulaire. L'existence de nombreux Wnt pose, bien sûr, la question de spécificité des mécanismes de transduction.

Il est clair qu'une combinaison d'approches biochimiques et génétiques sera nécessaire pour répondre à ces questions. L'isolement de *Dfz2*

devrait permettre de caractériser d'autres facteurs interagissant directement avec le produit de ce gène. Le chromosome X ne représentant qu'un cinquième environ du génome de drosophile, la recherche de mutations sur les autosomes devrait permettre d'en identifier un nombre important affectant la transmission du signal émis par Wg. A ce propos, notre laboratoire a récemment identifié quatre nouveaux locus probablement impliqués dans ce processus. Le clonage des gènes associés à ces mutations fournira sans doute de nouveaux éléments sur les modalités de transduction du signal émis par les Wnt ■

TIRÉS À PART

N. Perrimon.

Summary

Wingless signaling in Drosophila

The Drosophila Wingless protein is a glycoprotein of the Wnt protein family. These secreted signaling molecules have been implicated in a number of developmental processes. In addition, these proteins are associated with transforming cellular abilities as the abnormal expression of many Wnt family members is associated with oncogenesis. Studies on the role of Drosophila Wingless in embryonic segmentation have led to a paradigm to genetically dissect the signaling pathway activated by Wnts. Recent studies have identified the seven transmembrane proteins of the Frizzled family as putative receptors for Wnts. The activated receptor appears to regulate the activity of a number of cytoplasmic proteins that include the novel protein Dishevelled, the serine-threonine protein kinase Zeste-white 3 and the adhesion component β -catenin.