

Génétique et développement

Syndrome de Saethre-Chotzen et syndrome de Holt-Oram : implication de deux nouveaux gènes de développement, TWIST et TBX5

L'intérêt porté aux gènes codant pour des facteurs de transcription n'est pas récent. Mais, jusqu'à présent, les cliniciens ne se sentaient pas directement concernés par ces gènes se liant à l'ADN, et dont les mutations avaient surtout été étudiées au cours de l'embryogenèse afin de mieux comprendre les étapes essentielles du développement des vertébrés, comme la gastrulation par exemple, dans laquelle intervient une cascade de facteurs transcriptionnels pour en assurer le déroulement, participer à la formation du mésoderme et permettre la spécification de sous-populations de cellules mésodermiques [1]. Or, voici que deux de ces gènes viennent d'être impliqués dans d'importantes maladies malformatives humaines : le gène *TWIST* dans le syndrome de Saethre-Chotzen, et le gène *T-BOX 5* dans le syndrome de Holt-Oram. Désormais, ne doutons pas que la fascination qu'ils exerçaient sur les chercheurs et les biologistes va s'étendre aux cliniciens.

Le gène *TWIST* dans le syndrome de Saethre-Chotzen

Le syndrome de Saethre-Chotzen appartient cliniquement au groupe des craniosynostoses, ces syndromes, génétiques pour la plupart, comportant une fusion prématurée des sutures crâniennes associée à diverses autres malformations. Les maladies les plus communes, syndromes de Crouzon, d'Apert, de Pfeiffer, de Jackson-Weiss, sont dues, on le sait désormais, à des mutations dans les

gènes codant pour les récepteurs des facteurs de croissance FGF (FGFR) 1, 2, et plus rarement 3 (*m/s* n° 12, vol. 11, p. 1748-51 et n° 12, vol. 12, p. 1419). Pourtant, dès 1994, Jean-Claude Dreyfus montrait l'implication possible des régulateurs transcriptionnels dans certaines de ces maladies : mutations du gène *MSX2* dans la craniosténose de type Boston, lésion du gène *GLI3* à doigt de zinc dans le syndrome de Greig (ou céphalopolysyndactylie) dont le locus se trouve en 7p21 (*m/s* 1994 ; n° 2, vol. 10, p. 225 et n° 3, vol. 13, p. 411). Et comme le syndrome de Saethre-Chotzen, ou acrocéphalosyndactylie de type III, est situé sur le même chromosome, en position plus distale, il se demandait quel en était le gène responsable. Celui-ci vient enfin d'être découvert et, effectivement, il s'agit d'un gène codant pour un facteur de transcription, d'abord découvert chez la drosophile : *twist*. Il y joue un rôle fondamental dans la gastrulation : en son absence, le mésoderme et les organes internes qui en découlent ne se développent pas et l'involution de la partie antérieure, plus allongée, donne à l'embryon dans l'œuf un aspect tordu (*twisted*) [2]. Très conservé dans les espèces animales, il intervient dans l'organisation dorso-ventrale et rostro-caudale chez la souris [3]. A l'état homozygote, la délétion *twist* est létale chez les embryons de souris avec défaut de formation du tube neural, surtout au pôle céphalique, et une désorganisation des cellules mésenchymateuses avoisinantes qui doit entraîner des anomalies de la vascularisation, cause probable de la mort des embryons. A

l'état hétérozygote, les souris présentent des anomalies des os du crâne et des pattes postérieures (doigts surnuméraires) qui rappellent le syndrome de Saethre-Chotzen chez l'homme. La recherche du gène humain *TWIST*, candidat préférentiel dans le syndrome de Saethre-Chotzen, fut orientée par l'existence de plusieurs translocations chez des malades comportant toujours un point de cassure en 7p21 (le locus étant ensuite confirmé par analyse de ségrégation dans de nombreuses familles), et par la synténie de 7p21 avec la région du chromosome 12 murin où se trouve le gène *Twist*. Le gène *TWIST* humain fut isolé l'an passé par une équipe française [4]. Il appartient au groupe des gènes codant pour un facteur de la famille basique hélice-boucle-hélice (*b-HLH*, *basic helix-loop-helix*). Ce groupe comprend des gènes dont l'expression est tantôt ubiquitaire (*E12*, *E47*) (*m/s* 1995 ; n° 3, vol. 11, p. 482), tantôt spécifique de certains tissus (*MyoD*, *myogénine*) (*m/s* n° 5, vol. 12, p. 639) ou qui sont doués d'un potentiel oncogénique (*MYC*, *MAD*, *MAX*) (*m/s* n° 9, vol. 6, p. 923). Le motif b-HLH comprend un domaine basique se liant à l'ADN, suivi de deux hélices amphipathiques séparées par une boucle maintenant la structure tertiaire entre les éléments hélicoïdaux qui permettent la formation d'homo- ou d'hétérodimères avant la liaison à l'ADN. La séquence protéique de cette région HLH est très conservée parmi les espèces animales (100 % de similitude pour la boucle).

Tout récemment, et simultanément, deux équipes, l'une française du groupe d'Arnold Munnich, l'autre américaine, du groupe d'Ethylin Jabs, viennent de faire la preuve de l'implication du gène *TWIST* dans le syndrome de Saethre-Chotzen [5, 6]. Dans les familles étudiées, par différentes techniques (SSCP pour *single strand conformation polymorphism*, séquençage, entre autres), des mutations furent découvertes, ségrégeant avec la maladie, qui ne furent jamais observées chez les témoins: mutations faux-sens ayant pour conséquence des changements dans des acides aminés du domaine de liaison à l'ADN; mutations ponctuelles entraînant la création d'un codon de terminaison prématuré situé avant ou dans la première hélice; duplications-insertions sans rupture du cadre de lecture mais insérant une séquence de sept acides aminés dans la boucle du domaine HLH à des points différents mais proches l'un de l'autre (figure 1). L'altération de ce domaine démontre donc l'implication du gène *TWIST* dans le syndrome de Saethre-Chotzen, attestée aussi par la co-ségrégation de la mutation avec la maladie dans les familles, ainsi que par le retentissement phénotypique des mutations du gène murin chez la souris. Il faudra analyser encore d'autres mutations pour établir avec précision une corrélation clinico-biologique mais on peut déjà se demander si le ptosis et l'asymétrie faciale propres au syndrome de Saethre-Chotzen ne sont pas dus aux troubles de vascularisation consécutifs à la désorganisation des tissus dérivés du mésoderme, et l'on peut déjà affirmer qu'il s'agit d'une maladie par haplo-insuffisance. Désormais, on connaît donc les principaux gènes impliqués dans les craniosynostoses. Gageons cependant qu'un autre gène très voisin de *twist*, le gène *snail* [7], indispensable à la gastrulation chez la drosophile et codant en partie pour cinq motifs à doigt de zinc, pourrait bien être impliqué, chez l'homme, dans des syndromes de Saethre-Chotzen indé-

m/s n° 4, vol. 13, avril 97

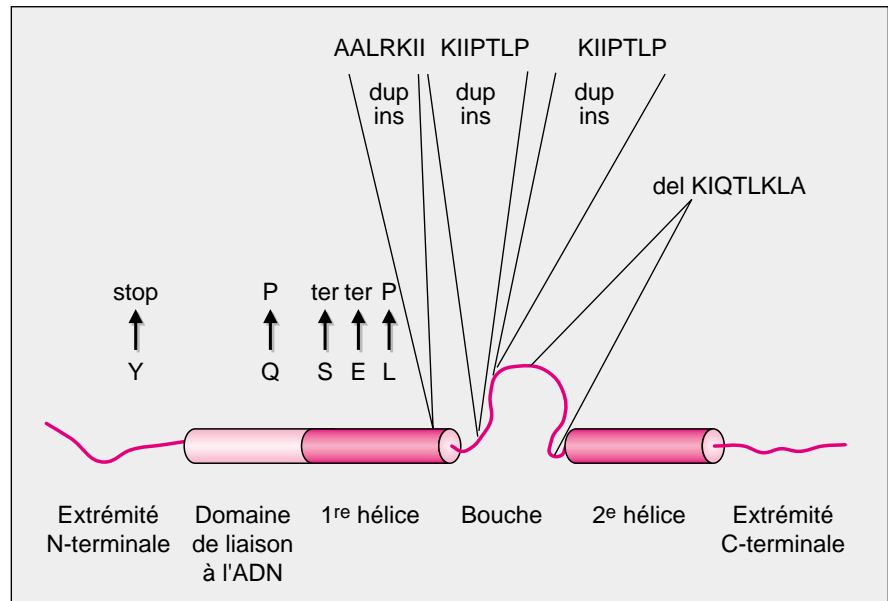


Figure 1. **Diagramme de la partie bHLH de la protéine *TWIST* et localisation des mutations observées chez des malades atteints de syndrome de Saethre-Chotzen.** Insertion d'une tyrosine (Y) en amont de la première hélice avec arrêt prématuré; mutation faux-sens: glutamine (Q) → proline (P); substitutions dans une sérine (S) et un acide glutamique (E) avec terminaison de la traduction; mutation faux sens: leucine (L) → proline (P); duplications-insertions à la première hélice, à la jonction hélice-boucle, et dans la boucle; délétion de huit acides aminés dans la boucle.

pendants du locus 7p21 ou des syndromes voisins. Mais l'importance de la découverte du rôle du gène *TWIST* dépasse le simple intérêt nosologique. Il y a tout lieu de supposer que ce gène intervient en amont des gènes *FGFR*, peut-être sur leur expression. Ceux-ci agiraient en interaction avec d'autres gènes, comme par exemple ceux qui codent pour les protéoglycanes, riches en sulfate d'héparane, ou pour les transporteurs de sulfates dont le rôle a déjà été démontré dans les chondrodysplasies (*m/s n° 6-7, vol. 12, p. 833*). L'ensemble des mécanismes moléculaires responsables des syndromes associant craniosynostose et anomalies des membres sera bientôt hiérarchisé (Tableau I). Quant à la confusion qui règne encore dans les corrélations phénotype-génotype, elle commence à s'amenuiser grâce au nombre croissant de cas où les mutations sont répertoriées, et surtout grâce à l'analyse précise de la structure

protéique et du rôle des récepteurs des FGF, ainsi que du retentissement spécifique des acides aminés substitués [8].

Le gène *T-BOX 5* dans le syndrome de Holt-Oram

En 1927, il y a tout juste 70 ans, à l'Institut du radium à Paris, Dobrovolskaia-Zavadskaia, découvrait une des premières mutations létales des mammifères: la mutation T. Les souris hétérozygotes pour ce « facteur » avaient la queue courte, et les embryons homozygotes ne se développaient pas [9, 10]. Le gène T, ou gène *Brachyury* (en grec: queue courte) fut cloné par l'équipe de Bernard Herrmann et Hans Lehrach [11] et sa découverte fut accueillie avec un grand intérêt par tous les chercheurs impliqués dans l'étude du développement [12]. Son expression chez l'embryon de souris de 9 jours, révélée par hybridation *in situ* avec l'ARNm T démontra son rôle dans la différen-

Tableau I					
GÈNES DE DÉVELOPPEMENT ET SYNDROMES CLINIQUES AVEC ANOMALIES CRANIOFACIALES					
Gènes	Localisation	Famille	Syndrome	Phénotype	
				Anomalies craniofaciales	Autres
<i>TWIST</i>	7p21	à motif b-HLH	S. de Saethre- Chotzen	cranosynostose asymétrie faciale ptosis	clinodactylie brachydactylie syndactylie
<i>GLI3</i>	7p13	Kruppel à dgt de Zn	S. de Greig	cranosynostose	poly- syndactylie
<i>MSX2</i>	5qter	HOX	craniosténose type Boston	cranosynostose	
<i>FGFR1</i>	8p11	récepteurs des	S. de Pfeiffer	cranosynostose	anomalies pouces et gros orteils
<i>FGFR2</i>	10q26		S. d'Apert S. de Crouzon S de Jackson- Weiss	cranosynostose cranosynostose cranosynostose	syndactylie retard mental anomalies gros orteils
<i>FGFR3</i>	4p16	FRG	S. de Baere- Stevenson	cranosynostose	<i>acantosis nigricans</i>
<i>PAX3</i>	2q25	PAX	S. de Waardenburg type I et III	dystopie des canthi hétérochromie irienne	anom. pigmentaires surdité
<i>MITF</i>	3q13	b-HLH/LZ	S. de Waardenburg II	<i>idem</i> sauf dystopie des canthi	anom. pigmentaires surdité
<i>SHH</i>	7p36	Sonic hedgehog	holoprosencéphalie	anom. des hémisph. cérébraux	retard mental cyclopie
<i>CBP</i>	16p13	CBP/p300	S. de Rubinstein- Taybi	dysmorphie faciale ptosis	retard mental anom. gros orteils
<i>XNP</i>	Xq13	hélicase S	ATR-X	dysmorphie faciale	retard mental Hb H
<i>Treacle</i>	5q32	inconnue	S. de Treacher- Collins	dysmorphie faciale hypoplasie malaire et mandibulaire	

Ces gènes ont déjà fait l'objet de présentations dans médecine/sciences et, pour plus de détail, le lecteur pourra se reporter aux références mentionnées ci-dessous. *TWIST*: (twisted) (cette nouvelle et m/s n° 3, vol. 13, p. 411); *GLI*: glioma associated oncogene homologue (m/s n° 2, vol. 10, p. 225); *MSX* ou *HOX8.1* (m/s n° 2, vol. 10, p. 225); *FGFR*: récepteurs des facteurs de croissance fibroblastique (m/s n° 1, vol. 11, p. 1748-51); *PAX*: paired; *MITF*: microphthalmia associated transcription factor (m/s n° 6-7, vol. 12, p. 8250 et vol. 13, p. 128); *SHH*: Sonic Hedgehog humain (m/s n° 15, vol. 10, p. 570 et n° 3, vol. 13, p. 411); *CBP*: CREB binding protein (m/s n° 10, vol. 11, p. 1795); *XNP*: X-linked nuclear protein (m/s n° 6, vol. 11, p. 910); *Treacle*: pour *Treacher-Collins* (m/s n° 4, vol. 12, p. 542). *b-HLA*: basis-helix-loop-helix; *LZ*: leucine zipper; *HbH*: hémoglobine H. *Dystopie des canthi*: malposition congénitale des angles des paupières.

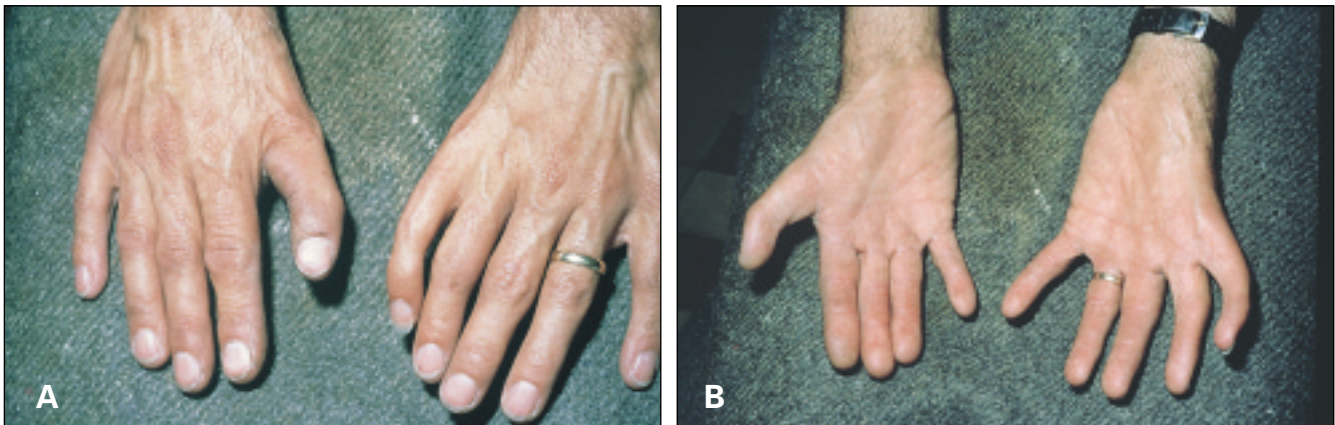


Figure 2. **Aspect des mains de deux sujets atteints de syndrome de Holt-Oram. A. Face dorsale des mains.** Il y a perte de l'opposition du pouce aux deux mains, mais la digitalisation et l'hypotrophie sont plus nettes à la main gauche. **B. Face palmaire des mains.** Le pouce est subnormal à la main droite mais digitalisé et atrophique à la main gauche. Les dermatoglyphes sont caractéristiques avec déplacement du triradius axial en position « t » (plus distale).

ciation de la ligne primitive, de la notochorde, et dans le développement du bourgeon caudal. Ce gène code pour un facteur de transcription qui possède, dans la région carboxy-terminale, deux paires de domaines régulateurs de la transcription (l'une l'activant et l'autre la réprimant), et dans la région amino-terminale, un long domaine transcriptionnel de liaison à l'ADN. Une homologie de séquence des acides aminés de ce domaine fut retrouvée dans le gène *omb* (*optomotor-blind*) de la drosophile [13]. Par la suite, cette partie du gène *Brachyury*, qui fut appelée la boîte T, fut retrouvée chez d'autres espèces et parfois en plusieurs exemplaires. Ainsi, chez la souris, on la retrouve dans sept autres gènes dont chacun joue un rôle spécifique dans le développement. Les gènes *Tbx2* et *Tbx4* sont sur le chromosome 11 murin (synténique du chromosome 17 humain) et les gènes *Tbx3* et *Tbx5* sont situés sur le chromosome 5 murin, synténique du chromosome 12 humain. Actuellement on connaît plus de vingt gènes à la boîte T.

Deux équipes, l'une internationale et l'autre américaine viennent de mettre en évidence des mutations dans le gène humain *TBX5* chez des

malades atteints de syndrome de Holt-Oram [14, 15].

Cette maladie, transmise en dominance, associe malformations cardiaques et anomalies radiales (figure 2). Ces dernières touchent surtout le pouce qui peut être triphalangé, hypoplasique ou absent, mais elles peuvent atteindre le radius, (limitation de la supination, hypoplasie, voire absence de radius). Quant aux malformations cardiaques, elles sont très variées, allant du trouble de la conduction à des défauts complexes comme la tétralogie de Fallot*, en passant par des communications auriculaires ou ventriculaires. On observe une variabilité phénotypique importante, même intrafamiliale. Les premiers remaniements chromosomiques observés chez certains malades ne furent d'aucune utilité car il devait s'agir d'associations fortuites, et c'est par analyse de ségrégation sur des familles très étendues qu'un locus fut trouvé sur le bras long du chromosome 12. Par la suite, un remaniement complexe avec point de cassure en 12q21 permit de réduire la

* Association d'une dextroposition de l'aorte, d'une sténose pulmonaire infundibulaire, d'une communication interventriculaire, avec hypertrophie ventriculaire droite.

zone d'intérêt. Par des techniques différentes (piégeage d'exons, hybridation *in situ* entre autres), les deux équipes isolèrent le gène *TBX5* ainsi désigné puisqu'il partage une homologie de séquence importante avec le gène murin *Tbx5*. Le gène *TBX3* fut aussi partiellement séquencé mais aucune mutation ne fut décelée chez des malades. En revanche, huit mutations furent découvertes (dans cinq familles et trois cas sporadiques) dans le gène *TBX5*, à type de substitution ou de duplication-insertion, dont la conséquence sur la protéine présumptive est la perte de la boîte T et, selon toute probabilité, la capacité de se lier à l'ADN. Il doit en résulter une absence de transcription des gènes agissant en aval dans le développement du mésoderme. L'expression du gène fut recherchée non seulement chez des embryons de souris mais aussi sur des embryons humains (ce qui est maintenant possible aux USA), avec une attention toute particulière sur le développement du cœur. On sait que, chez l'homme, le cloisonnement du tube cardiaque débute au 27^e jour de gestation, et que les bourgeons des membres supérieurs deviennent visibles au 26^e jour. Sur des coupes d'embryon de 26 jours, l'expression est maximale dans la

partie initiale du tube cardiaque primitif. Elle est nette dans la paroi et le septum auriculaires, ainsi que dans le sinus coronaire. A un stade plus tardif, on la retrouve à un degré moindre dans les bourrelets endocardiques auriculo-ventriculaires. Étant donné le nombre d'embryons limités dont disposaient les chercheurs, il ne fut pas possible de reconstituer complètement le déroulement temporo-spatial de l'expression de *TBX5*. Mais puisque les mutations ont des répercussions aussi bien sur le tissu nodal que sur le développement des cavités et sur le cloisonnement, qui sont des processus distincts, on peut supposer que *TBX5* intervient au début de la morphogénèse cardiaque, soit en activant, soit en interagissant avec d'autres gènes, tels que les gènes *TEF1* (*transcriptional enhancer factor*), *RXR α* (*retinoid X receptor alpha*) et *N-MYC*, et le gène codant pour la neurogénine, connus pour participer au mécanisme complexe de la cardiogénèse (*m/s n° 1, vol. 11, p. 132*), lesquels interviennent à leur tour sur d'autres gènes en aval. Dans les autres tissus, l'expression de *TBX5* est visible entre le 33^e et le 52^e jour dans les membres supérieurs, la trachée, les poumons et la paroi thoracique, ainsi que, de façon discrète, dans la rétine et le télencéphale. Or, des agénésies du muscle pectoral ainsi que des anomalies oculaires ont été rapportées dans des syndromes de Holt-Oram.

La découverte d'un gène *TBX* dans le syndrome de Holt-Oram donne à penser que d'autres gènes de la même famille interviennent peut-être dans d'autres maladies humaines. *TBX3*, localisé lui aussi

sur le chromosome 12, est un candidat éventuel pour le syndrome de Noonan ou le syndrome UMS (*ulnar-mammary syndrome*) – comportant des anomalies des membres, une hypoplasie mammaire et des anomalies génitales –, qui sont cartographiés dans cette même région. Elle permet d'espérer une meilleure connaissance des causes des autres malformations cardiaques congénitales dont la fréquence n'est pas négligeable (1/1 000 naissances).

N'en doutons pas, alors que la découverte de l'implication du gène *TWIST* dans le syndrome de Saethre-Chotzen vient parfaire l'ensemble des connaissances assez complètes dont nous disposons déjà sur les craniosténoses et les syndromes voisins, celle du gène *TRX5* dans le syndrome de Holt-Oram représente le premier pas dans l'exploration moléculaire des gènes de développement impliqués dans les cardiopathies congénitales et les malformations de la région thoracique chez l'homme, comme le syndrome de Poland (agénésie du grand pectoral) ou les syndromes apparentés ■

Accès à la base de données internationale en Immunogénétique : IMGIT

La base de données internationale ImMunoGeneTics, IMGIT, initiée et coordonnée par Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France, est accessible sur le serveur WWW du CNUSC (<http://imgt.cnusc.fr:8104>). IMGIT comprend deux bases de données : LIGM-DB (Immunoglobulines et Récepteurs T) et MHC/HLA-DB. IMGIT/LIGM-DB contient à ce jour plus de 19 000 séquences (13 798 séquences d'immunoglobulines et 5 850 séquences de récepteurs T) de 78 espèces différentes. Les fichiers à plat sont accessibles sur le serveur ftp anonyme d'EMBL-EBI (<ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/imgt>).

Contact :

Prof. Marie-Paule Lefranc, Coordinateur de IMGIT
Tel. : +33 (0)4 67 61 36 34 - Fax : +33 (0)4 67 04 02 31/45
E-mail : lefranc@ligm.crbm.cnrs-mop.fr

RÉFÉRENCES

1. Joly JS, Cohen-Tannoudji M. L'unité de la gastrulation chez les vertébrés. *Med Sci* 1994; 10: 84-90.
2. Simpson P. Maternal-zygotic gene interaction during formation of the dorsoventral pattern in drosophila embryos. *Genetics* 1983; 105: 615-32.
3. Stoetzel C, Weber B, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Perrin-Schmitt F. Dorso-ventral and rostro-caudal sequential expression of M-twist in the post-implantation murine embryo. *Mechan Dev* 1995; 51: 251-63.
4. Bourgeois P, Stoetzel C, Bolcato-Bellemin AL, Mattei MG, Perrin-Schmitt F. The human *H-Twist* gene is located at 7p21 and encodes a B-HLH protein that is 96% similar to its murine M-twist counterpart. *Mammalian Genome* 1996; 7: 915-7.
5. Ghouzzi VE, Le Merrer M, Perrin-Smitt F, Lajeunie E, Benit, et al. Mutations of the *TWIST* gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 1997; 15: 42-6.
6. Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, et al. Mutations in *TWIST*, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 1997; 15: 36-41.
7. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archs Dev Biol* 1984; 193: 267-282.
8. Dobrovolskaia-Zavadskaia N. Sur la mortification spontanée de la queue chez la souris nouveau-née et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire « non viable ». *C R Séan Soc Biol* 1927; 97: 114-6.
9. Silver L, Babinet C. Le clonage du locus T de la souris: une mutation du développement connue depuis longtemps entre dans l'âge de la biologie moléculaire. *Med Sci* 1990; 6: 574-5.
10. Oldridge M, Lunt PW, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Muenke M, et al. Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the IgII-IgIII linker of FGFR2. *Nature Genet* 1997; 6: 137-43.
11. Herrmann B, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990; 343: 617-22.
12. Camus A, Babinet C. Brachyury. Un gène essentiel pour la gastrulation et la formation du mésoderme. *Med Sci* 1993; 9: 1118-21.
13. Pflugfelder G, Roth H, Poock B. A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse brachyury involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 918-25.
14. Li QY, Nexbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis ARJ, et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nature Genet* 1997; 15: 21-9.
15. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, et al. Mutations in human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genet* 1997; 15: 30-5.

Simone Gilgenkrantz

Professeuse émérite de génétique, 9, rue Basse, 54330 Clerey/Brenon, France.

TIRÉS À PART

S. Gilgenkrantz.