

SOX10, un modulateur de la transcription impliqué dans la maladie de Hirschsprung

Les neurocristopathies sont un groupe hétérogène de maladies ayant en commun des anomalies du développement des crêtes neurales ou de certains de leurs dérivés. Parmi celles-ci, la maladie de Hirschsprung, ou mégacôlon congénital, a été associée à des mutations du proto-oncogène *RET* et des gènes codant pour l'endothéline 3 et le récepteur B des endothélines (Tableau I). Cependant, la majorité des cas n'ont pas encore trouvé d'explication moléculaire. L'étude d'un modèle murin de cette maladie, la souris *Dominant megacolon*, nous a permis d'impliquer SOX10, un modulateur de transcription, dans certains cas d'une forme syndromique de la maladie : le syndrome de Shah-Waardenburg.

La maladie de Hirschsprung

La maladie de Hirschsprung, ou mégacôlon congénital, est une affection fréquente de la motricité intestinale (1/5 000 naissances) qui se caractérise par l'absence des cellules ganglionnaires dans les plexus intramurales de l'intestin distal. Il en résulte une agénésie du segment intestinal aganglionnaire avec dilatation réactionnelle du côlon sus-jacent, à l'origine du nom de mégacôlon. La majorité des cas sont sporadiques mais il existe 10 % à 20 % de formes familiales. Bien que l'aganglionose intestinale soit le plus souvent isolée, des associations cliniques significatives avec d'autres anomalies ont été notées, parmi lesquelles la trisomie 21, certaines malformations cardiaques, et des anomalies

de type Waardenburg (surdité, dépigmentation) (*m/s n°1, vol. 11, p. 133*) [1].

La voie de transduction RET/GDNF

Le premier gène impliqué dans la maladie de Hirschsprung fut le proto-oncogène *RET*, codant pour un récepteur membranaire à activité tyrosine-kinase [2]. Des mutations entraînant une perte de fonction, réparties sur l'ensemble du gène, sont responsables de 10 % à 20 % des formes sporadiques et jusqu'à 50 % des formes familiales (pour revue, voir [3]). Il s'agit essentiellement de formes isolées de la maladie, c'est-à-dire non syndromiques. La transmission est dominante avec une pénétrance incomplète et une expressivité variable, y compris au sein d'une seule et même famille. On a donc suspecté l'existence de gènes modificateurs pouvant influencer l'expression phénotypique des mutations de *RET*.

Le ligand de *RET* a été caractérisé durant l'été 1996 : il s'agit du *glial cell*

line-derived neurotrophic factor (GDNF), un facteur de croissance des neurones dopaminergiques en culture [4, 5]. Des variations de séquences de *GDNF* ont été observées dans la maladie de Hirschsprung, mais elles ne sont ni nécessaires, ni suffisantes pour la provoquer (pour revue, voir [3]). Il semblerait donc que, plus qu'un gène responsable de l'aganglionose, *GDNF* soit un gène modificateur de l'expression de la maladie. La faible implication apparente des mutations de *GDNF* a conduit certaines équipes à s'interroger sur l'existence d'autres ligands de *RET*. C'est ainsi qu'il a été montré que la neurturine (NTN) avait également la capacité de se lier à *RET* et d'activer la transduction du signal [6-8], pouvant dès lors constituer une voie alternative à la voie GDNF.

Ces deux ligands nécessitent des co-récepteurs pour se lier à *RET*. *GDNFR α* , co-récepteur de *GDNF* [9], ne semble pas impliqué dans la maladie [11]. La mise en évidence d'autres co-récepteurs est récente et leur rôle

Homme			Souris		
Chr	Gène	Mutant	Chr	Gène	
10q11.2	<i>RET</i>	AD Transgénique (<i>knock-out</i>)	6	<i>Ret</i>	AR
13q22	<i>EDNRB</i> (AR)	<i>piebald lethal (sl/sl)</i>	14	<i>Ednrb</i>	AR
20q13.2	<i>EDN3</i> (AR)	<i>lethal spotting (ls/ls)</i>	2	<i>Edn3</i>	AR
22q13	<i>SOX10</i>	AD <i>Dominant megacolon (Dom/+)</i>	15	<i>Sox10</i>	ASD

AD : autosomique dominante ; AR : autosomique récessive ; ASD : autosomique semi-dominante.

éventuel dans l'aganglionose intestinale demande à être étudié, mais une certaine redondance de ces molécules pourrait expliquer un taux de mutation faible ou nul.

La voie de transmission EDNRB/EDN3

L'hétérogénéité de la maladie de Hirschsprung a pu être démontrée avec l'implication de l'endothéline 3 (EDN3) et du récepteur B des endothélines (EDNRB) dans des formes isolées de la maladie de Hirschsprung ainsi que dans le syndrome de Shah-Waardenburg (*m/s n° 8, vol. 11, p. 1172*) (pour revue, voir [3]). La transmission est plutôt de type récessif, mais les hétérozygotes peuvent présenter une expression incomplète de la maladie, avec cependant une pénétrance plus faible.

D'autres gènes du métabolisme des endothélines ont été étudiés. Il semble qu'ils ne soient pas ou peu impliqués dans la maladie, et la fréquence de mutation des gènes des endothélines et de leur cascade dans la maladie de Hirschsprung isolée ou syndromique serait donc inférieure à 5 %.

La souris *Dominant megacolon*

Il existe trois modèles murins spontanés de la maladie de Hirschsprung, associant aganglionose et dépigmentation. Les deux premiers sont de transmission récessive en ce qui concerne l'aganglionose, bien que les hétérozygotes présentent un phénotype de dépigmentation intermédiaire. Le mutant *lethal spotting* porte une mutation ponctuelle dans le gène de l'endothéline 3 [11], et le mutant *piebald lethal* une délétion du gène du récepteur B des endothélines (*m/s n° 8, vol. 11, p. 1172*) [12]. Le troisième modèle est la souris *Dominant megacolon* (*Dom*), de transmission semi-dominante. Les hétérozygotes *Dom/+* présentent une aganglionose dont l'étendue varie en fonction de l'environnement génétique, ainsi que des pattes blanches et une tache blanche ventrale de surface variable [13]. Les homozygotes ont été décrits initialement comme mourant *in utero*; cependant, en faisant varier le contexte génétique,

nous avons pu observer pour certains d'entre eux ont une mort périnatale. L'effet de la mutation *Dom* a pu être mesuré par le retard de colonisation de l'intestin par les neuroblastes au cours du développement embryonnaire [14]. Enfin, l'étude des chimeres obtenues par agrégation d'embryons *Dom/+* et d'embryons *+/+* a montré la présence de cellules ganglionnaires entériques provenant des deux sources, suggérant une anomalie du micro-environnement intestinal plutôt qu'un défaut neuroblastique intrinsèque [15].

La mutation *Dom* a été initialement cartographiée sur le chromosome 15 murin. Afin de caractériser le gène *Dom*, nous avons entrepris un clonage positionnel de ce gène [16, 17].

SOX10 : un modulateur de la transcription

Le gène *Sox10* a été cloné récemment par l'équipe de Michael Wegner (Hambourg, Allemagne) à partir de lignées cellulaires gliales de rat [18]. Comme toutes les protéines SOX, SOX10 possède un domaine de liaison à l'ADN qui a une forte analogie structurale avec le domaine HMG (*high-mobility group*) du facteur de détermination sexuelle SRY [19]. *Sox10* est exprimé de façon prédominante dans les cellules gliales. Pendant le développement embryonnaire, *Sox10* apparaît d'abord dans les cellules de la crête neurale, puis dans les dérivés qui contribuent à la formation du système nerveux périphérique et se différencient en cellules de Schwann. Dans le système nerveux central, l'expression de *Sox10*, initialement limitée aux précurseurs des cellules gliales, est ensuite observée dans les oligodendrocytes du cerveau adulte. SOX10 ne semble doué, au moins chez les rongeurs, d'aucune activité transcriptionnelle autonome *in vitro*, mais il potentialise fortement l'activité du facteur de transcription à domaine POU TST-1/POU3f1 avec lequel il est co-synthétisé à certains stades du développement des cellules de Schwann. SOX10 est aussi capable de moduler la fonction de PAX3 et de KROX-20, deux autres facteurs de transcription impliqués dans le développement des cellules de Schwann.

SOX10 est impliqué dans le développement des cellules de la crête neurale

Chez la souris *Dom*, l'insertion d'une guanine après la position 579 de la séquence codante de *SOX10* entraîne un décalage de la phase de lecture avec génération d'un codon stop prématuré. La mutation se situe peu après le domaine HMG de liaison à l'ADN, qui reste donc intact. Il en résulte une protéine tronquée qui, bien que pouvant se lier à l'ADN, est incapable de permettre l'activation de la transcription d'un gène rapporteur *in vitro* par les facteurs de transcription TST-1 et PAX3.

Chez l'embryon *Dom/Dom*, l'absence de la fonction SOX10 se traduit par l'involution de certaines des structures dérivées des crêtes neurales, en particulier au niveau des ganglions des nerfs crâniens et du système nerveux entérique. Des résultats assez similaires ont été obtenus récemment par l'équipe de William Pavan (Bethesda, Md, USA) [20], mais la taille de la protéine telle qu'ils la décrivent est plus grande, due à l'usage d'un autre ATG d'initiation. Ce point est naturellement en cours de vérification mais n'est pas résolu à l'heure actuelle. Il faut enfin noter que les résultats de l'équipe de William Pavan suggèrent un mécanisme d'apoptose conduisant à la disparition de certains neurones chez la souris *Dom* homozygote.

Des mutations de SOX10 dans le syndrome de Shah-Waardenburg

Le gène *SOX10*, situé sur le chromosome 22q13 chez l'homme, est composé de cinq exons. Nous avons étudié la séquence codante de ce gène chez 34 patients atteints de maladie de Hirschsprung isolée, et où *RET*, *EDN3* et *EDNRB* ne sont pas impliqués. Nous n'avons trouvé aucune mutation de *SOX10* chez ces patients, qu'il s'agisse de cas sporadiques ou familiaux. En revanche, l'étude de différentes formes syndromiques nous a permis de détecter des mutations chez quatre malades présentant un syndrome de Shah-Waardenburg [21].

Le syndrome de Waardenburg se caractérise par l'association d'une

surdité et d'anomalies de pigmentation qui peuvent toucher la peau, l'iris, les cheveux et les sourcils (*m/s n° 1, vol. 11, p. 133*) (pour revue, voir [22]). Selon les symptômes associés, on en distingue quatre types (*figure 1*). Le syndrome de Waardenburg de type 4 (WS4) se caractérise par l'association avec la maladie de Hirschsprung, c'est-à-dire une aganglionose intestinale. Il est également appelé syndrome de Shah-Waardenburg, ou syndrome de Hirschsprung-Waardenburg. Certains cas ont pu être expliqués par des mutations homozygotes des gènes *EDN3* ou *EDNRB*.

Nous montrons maintenant que des mutations de *SOX10* peuvent également être responsables d'un syndrome de Shah-Waardenburg (*figure 2*). Les mutations sont détectées à l'état hétérozygote, et le seul cas familial montre une transmission dominante. Pour au moins deux de ces mutations, le mécanisme en cause est très probablement une haplo-insuffisance. Il est notable que l'expressivité variable, fréquente dans les neurocristopathies, s'observe également ici. L'aganglionose intestinale peut être présente ou absente mais des troubles intestinaux différents peuvent également être observés; la surdité peut être absente, plus ou moins profonde, unilatérale ou bilatérale; enfin, s'il existe des anomalies de pigmentation dans tous les cas que nous avons étudiés, celles-ci varient d'un individu à l'autre y compris au sein d'une même famille. Là encore, on peut sans doute postuler l'existence de gènes modificateurs.

Hétérogénéité génétique et physiopathologie de la maladie de Hirschsprung

Voici donc documentée un peu plus l'hétérogénéité d'une maladie déjà complexe. Il reste à vérifier à plus grande échelle si *SOX10* peut ou non être responsable d'aganglionose intestinale isolée. L'association entre aganglionose intestinale, dépigmentation et surdité mises en évidence dans le syndrome de Shah-Waardenburg pourrait s'expliquer par une

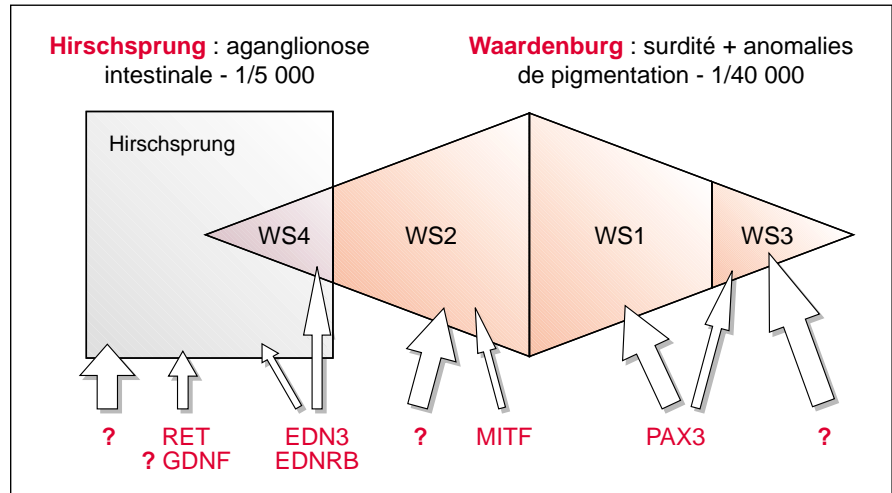


Figure 1. **Maladie de Hirschsprung et syndrome de Waardenburg.** Définition et gènes impliqués. WS1: syndrome de Waardenburg de type 1 (surdité, anomalies de pigmentation, dystopie des canthus). WS2: syndrome de Waardenburg de type 2 (surdité, anomalies de pigmentation). WS3: syndrome de Waardenburg de type 3 ou syndrome de Klein-Waardenburg (surdité, anomalies de pigmentation, anomalies des membres). WS4: syndrome de Waardenburg de type 4 ou syndrome de Shah-Waardenburg (surdité, anomalies de pigmentation, aganglionose intestinale).

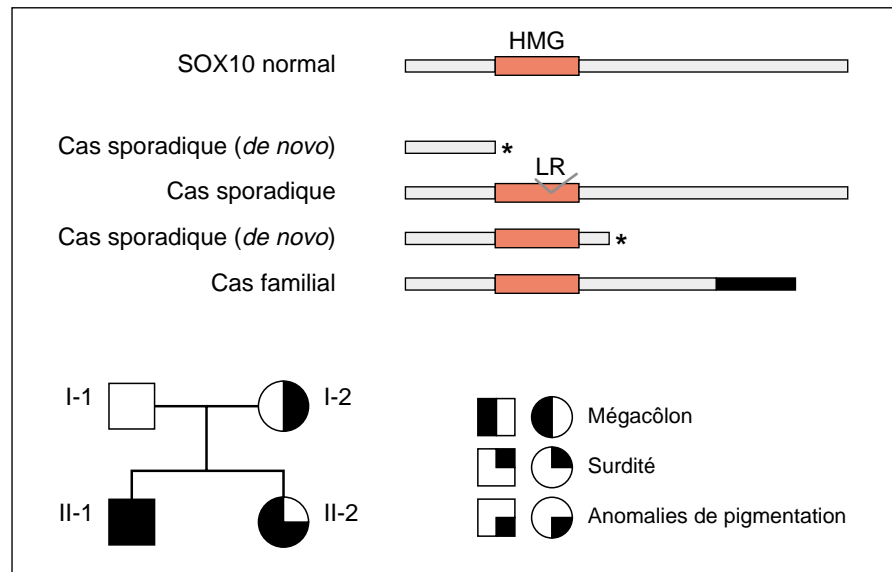


Figure 2. **Mutations de *SOX10* dans le syndrome de Shah-Waardenburg.** La protéine *SOX10* est figurée ainsi que les protéines anormales résultant des 4 mutations. HMG: domaine de liaison à l'ADN. *: mutation stop. ∇: insertion; Boîte noire: nouvelle séquence protéique engendrée par décalage du cadre de lecture. L'expressivité variable de la maladie est illustrée par l'arbre généalogique du cas familial.

origine commune à certaines cellules. En effet, les mélanoblastes, comme les neurones entériques et certaines cellules de l'oreille interne, dérivent des crêtes neurales. On ne

sait pas s'il existe un progéniteur commun spécifique de ces trois voies, ou si un mécanisme identique de différenciation se met en place en parallèle dans des lignées cellulaires déjà

individualisées. Cependant, la mise en évidence d'un puissant effet mitogène de l'endothéline 3 sur les cellules de crête neurale *in vitro* [23], ainsi que l'expression très précoce de *SOX10*, pourraient arguer en faveur de la première solution.

Par quel mécanisme *SOX10* est-il responsable de l'aganglionose ? On sait qu'il existe de nombreux échanges d'information entre un axone et les cellules de Schwann au cours de leur développement conjoint. L'anomalie des cellules gliales provoquée par les mutations de *SOX10* serait-elle indirectement cause de la disparition des neurones entériques, incapables de se développer normalement ou de survivre en l'absence de cellules de Schwann ? Ou existerait-il un défaut intrinsèque du neuroblaste qui exprimerait également une protéine *SOX10* anormale ? Rien ne permet aujourd'hui de répondre. Cependant, si la première solution s'avérait la bonne, il s'agirait d'un mécanisme complètement nouveau pour la maladie de Hirschsprung.

Conclusion

Les neurocristopathies regroupent un ensemble de syndromes différents, aux limites souvent floues, intriqués les uns dans les autres, et souvent sans relations précises entre les symptômes clinique et la génétique moléculaire. Témoin en est l'implication de certains gènes dans plusieurs de ces neurocristopathies ; témoin en est aussi le fait que nombre d'entre elles sont multigéniques ; témoin en est encore, si besoin, le rôle des gènes modificateurs documenté pour plusieurs d'entre elles ou l'absence de relation mutation/phénotype. Aussi n'est-il pas exclu que *SOX10* puisse être impliqué dans d'autres neurocristopathies que le syndrome de Shah-Waardenburg.

Après la mise en évidence du rôle des endothélines dans les processus du développement, après l'implication d'un facteur de transcription glial dans l'embryogenèse du système nerveux entérique, il se pourrait que la génétique de la maladie de Hirschsprung et des neurocristopathies en général nous réserve encore quelques surprises ■

RÉFÉRENCES

1. Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 568-80.
2. Lyonnet S, Edery P, Attie T, Nihoul-Fekete C, Munnich A. Des mutations du proto-oncogène RET dans la maladie de Hirschsprung: un gène à tout faire. *Med Sci* 1994; 10: 450-3.
3. Hofstra RMW, Osinga J, Buys CHCM. Mutations in Hirschsprung disease: when does a mutation contribute to the phenotype. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 180-5.
4. Chappuis S, Geneste O, Pasini P, Lenoir G, Billaud B. RET et GDNF: un récepteur orphelin trouve une famille nourricière. *Med Sci* 1996; 12: 1408-13.
5. Salomon R, Attié R, Bidaud C, Lyonnet S, Munnich A. Le ligand de RET est également impliqué dans la maladie de Hirschsprung. *Med Sci* 1996; 12: 1414-6.
6. Klein R, Sherman D, Ho WH, Stone D, Bennet G, et al. A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 1997; 387: 717-21.
7. Buj-Bello A, Adu J, Piñon L, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, Chinchetru M, Buchman V, Davies A. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1997; 387: 721-4.
8. Baloh R, Tansey M, Golden J, Creedon D, Heuckeroth R, Keck C, Zimonjic R, Popescu N, Johnson E, Milbradt J, TrnR2, a novel receptor that mediates Neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron* 1997; 18: 793-802.
9. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-24.
10. Gosling A, Myers SM, von Deimling A, Mulligan LM. Mutation analysis of GDNFR- α in Hirschsprung disease patients (abstract). *Am J Hum Genet* 1997; 61: 2401.
11. Greenstein Baynash A, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hamer RE, Yanagisawa M. Interaction of Endothelin-3 with Endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994; 79: 1277-85.
12. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994; 79: 1267-76.
13. Lane PW, Liu HM. Association of megacolon with a new dominant spotting gene (*Dom*) in the mouse. *J Hered* 1984; 75: 435-9.
14. Puliti A, Poirier V, Goossens M, Simonneau M. Neuronal defects in genotyped Dominant megacolon (*Dom*) mouse embryos, a model for Hirschsprung disease. *NeuroReport* 1996; 7: 489-92.
15. Kapur RP, Livingston R, Dogget B, Sweetser DA, Siebert JR, Palmiter RD. Abnormal microenvironmental signals underlie intestinal aganglionosis in Dominant megacolon. *Development* 1996; 174: 360-9.
16. Puliti A, Prehu MO, Simon-Chazotte S, Ferkdadjji L, Peuchmaur M, Goossens M, Guénet JL. A high resolution genetic map of mouse chromosome 15 encompassing the Dominant megacolon (*Dom*) locus. *Mamm Genome* 1995; 6: 763-8.
17. Pingault V, Puliti A, Prehu MO, Samadi A, Bondurand N, Goossens M. Human homology and candidate genes for the dominant megacolon locus, a mouse model of Hirschsprung disease. *Genomics* 1997; 39: 86-9.
18. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 1998; 18: 237-50.
19. Gozé C, Soullier S, Poulat F, Desclozeaux M, Jay P, Laudet V, Berta P. Le sexe et les *SOX*. *Med Sci* 1996; 12: 1097-104.
20. Southard-Smith E, Kos L, Pavan W. *Sox10* mutation disrupts neural crest development in *Dom* Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 1998; 18: 60-4.
21. Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich D, Prêhu MO, Puliti A, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith G, Read A, Wegner M, Goossens M. *SOX10* mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1998; 18: 171-3.
22. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet* 1997; 34: 656-65.
23. Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM. Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3892-7.

**Véronique Pingault
Nadège Bondurand
Michel Goossens**

Unité de génétique moléculaire et physiopathologie, Inserm U. 468, Hôpital Henri-Mondor, 94010 Créteil, France.

TIRÉS À PART

M. Goossens.