

Dissection moléculaire de la voie de transmission du signal Hedgehog

Des études récentes ont montré que les protéines de la famille Hedgehog (Hh) sont des molécules « signal » qui contrôlent de nombreux processus d'induction et de morphogenèse au cours du développement de la drosophile et des vertébrés [1, 2]. En outre, il a été montré dans les derniers mois que plusieurs affections humaines étaient causées par des dysfonctionnements de la signalisation Hh (*m/s* n° 2, vol. 13, p. 229; n° 3, vol. 13, p. 402) [3]. Le premier membre de cette famille a été identifié chez la drosophile. Les propriétés organisatrices de cette protéine sont observées à la frontière antéro-postérieure des segments embryonnaires et des disques imaginaux larvaires, qui sont les *primordia* des organes externes de l'adulte. Les cellules du compartiment postérieur des segments embryonnaires sécrètent la protéine Hh, qui va agir sur les cellules voisines antérieures pour contrôler l'expression d'une protéine sécrétée de la famille Wnt, Wingless (Wg). Cette dernière va en retour maintenir l'expression d'Hh dans les cellules postérieures, assurant ainsi une production constante de ces protéines sécrétées, dont dépend le maintien de la frontière compartimentale antéro-postérieure, et la spécification de l'ensemble des cellules du segment [4]. De même, la protéine Hh sécrétée par les cellules du compartiment postérieur du disque d'aile va induire, le long de la frontière antéro-postérieure de ce disque, l'expression d'une protéine sécrétée de la famille TGFβ, Decapentaplegic (Dpp). Cette protéine, va agir dans les compartiments antérieur et postérieur du disque, en tant que morphogène pour spécifier le destin de

l'ensemble des cellules de l'aile. [5-8]. Ainsi, dans ces deux structures, Hedgehog est à l'origine d'une source de protéines sécrétées, et chaque cellule va finalement se différencier en fonction de la distance qui la sépare du *centre organisateur* ainsi créé. Chez les vertébrés il existe plusieurs gènes homologues de Hh. L'un d'entre eux, *Sonic hedgehog* (*Shh*) est également exprimé dans les centres organisateurs embryonnaires que constituent la corde [2] et le mésenchyme postérieur du bourgeon de membre appelé « zone d'activité polarisante » (ZPA). A partir de la corde, la protéine Shh va agir directement, à courte et à longue distance, pour induire les

structures ventrales du tube neural [9], et pour polariser les somites [10]. A partir de la ZPA, Shh va polariser le bourgeon de membre *via* l'induction du signal relais que constitue la protéine sécrétée BMP2, qui appartient, comme Dpp, à la famille TGFβ [11].

Les gènes impliqués dans le signal Hedgehog

Comment l'information Hh/Shh est-elle transmise aux cellules cibles? Des cribles génétiques réalisés chez la drosophile ont permis d'identifier huit gènes qui interviennent dans le processus de transmission du signal Hh (*Tableau I*) [12]. Certains tels que

Tableau I

PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE CONTRÔLE DE LA VOIE HEDGEHOG

Action sur les cibles de Hh	Nom	Nature et fonction proposée
- <i>Patched</i>	Ptc	12 domaines transmembranaires, récepteur Hh
+ <i>Smoothened</i>	Smo	7 domaines transmembranaires, famille des serpentines
+ Fused	Fu	Ser-Thr protéine-kinase
- Suppresseur de Fused	Sufu	présence d'une séquence de type PEST
- Costal-2	Cos-2	kinésine, fixation aux microtubules
- <i>Slimb</i>	Slimb	présence de domaines F et WD, ciblage de la dégradation de Ci?
- Protéine kinase A	PKA	Ser-Thr protéine-kinase dépendante de l'AMPC
+ <i>Cubitus interruptus</i>	Ci	facteur de transcription à doigts de Zn (type Gli)
+ CREB binding protein	CBP	co-activateur de Ci

En italiques: homologue connu chez les mammifères.
En noir: action requise pour réponse à Hh.
En rouge: antagonistes de Hh.

patched (ptc), *costal-2 (cos-2)* et le gène codant pour la protéine-kinase dépendante de l'AMPc (PKA) ont une action négative sur la voie Hedgehog puisque leur perte de fonction entraîne l'expression ectopique de ses gènes cibles, tels que *wg* dans l'embryon, ou *dpp* dans le disque d'aile. Au contraire, *smoothened (smo)*, *fused (fu)* et *cubitus interruptus (ci)* sont requis pour l'activation de ces gènes cibles en réponse au signal Hh. L'existence chez les vertébrés de gènes codant pour des protéines dont la séquence et la fonction sont similaires à celles, respectivement, de Ptc, PKA, Smo et Ci sont révélateurs

de la remarquable conservation de la voie Hh dans le monde animal [1] (voir l'article de P. Gorry et D. Lacombe, p. 607 de ce numéro).

Les récepteurs membranaires

Récemment, plusieurs laboratoires ont entrepris une analyse moléculaire des différentes protéines de la voie Hh et de leurs interactions. Cette approche, développée en étroite relation avec les données génétiques, a permis de préciser les grandes étapes de la transmission du signal Hh, de sa réception à l'activation des gènes cibles (figure 1).

Deux protéines transmembranaires, Ptc et Smo, avaient été préalablement identifiées comme récepteurs potentiels d'Hh/Shh. Des expériences de co-immunoprécipitation et de *cross-linking* réalisées à partir de cellules de mammifères en culture et dans des ovocytes de xénope indiquent que le signal Shh/Hh se fixe à un récepteur hétérodimérique formé par l'association de ces deux protéines [13-16]. En absence de ligand, Ptc inhiberait l'activité constitutive de Smo; la fixation de Shh/Hh à Ptc (mais apparemment pas à Smo), aurait pour effet de lever cette inhibition (*m/s n°3, vol. 13, p. 402*). La fixation de Hh/Shh à Ptc aurait également comme conséquence de restreindre la diffusion du signal, limitant ainsi son champ d'action au strict voisinage de sa source de production [17]. Par ailleurs, on peut remarquer que la signalisation par Hh est soumise à un rétrocontrôle, dans la mesure où, dans tous les systèmes connus faisant intervenir un signal de ce type, l'expression du gène *ptc*, qui code pour un régulateur négatif de la voie, est augmentée par le signal. Enfin, malgré les similitudes que présente Smo avec les récepteurs des protéines G, et Ptc avec les pompes échangeuses d'ions, aucune donnée fonctionnelle ne permet actuellement d'élucider leur mode d'action.

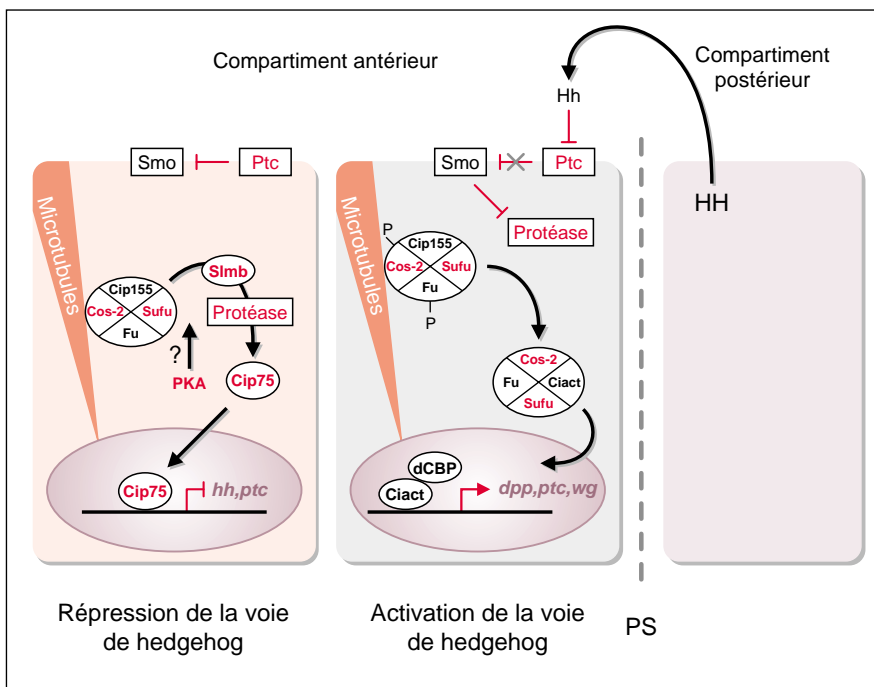


Figure 1. **Contrôle de l'expression des gènes cibles de Hedgehog (Hh) en l'absence et en présence du signal.** Dans les cellules qui ne reçoivent pas le signal Hh, l'activité de Smoothened (Smo) est réprimée par Patched (Ptc). Le complexe Cos-2/Fu/Sufu/Ci est associé aux microtubules. Ce complexe, ainsi que l'action de la PKA favorisent le clivage de Ci en sa forme répressive Cip75. Ci est probablement ciblée vers le protéasome grâce à la protéine à domaine F, Slmb. La forme tronquée Cip75 réprime l'expression des gènes *ptc* et *hh*. La réception du signal Hh par Ptc lève l'effet inhibiteur exercé par Ptc sur Smo et s'oppose à l'effet de la PKA. Cela induit une activation de Fu qui inhibe alors Cos-2 et Sufu. Par conséquent, le complexe se sépare des microtubules et la protéolyse de Ci diminue, favorisant l'accumulation d'une forme longue de Ci, Cip155. Cette forme longue est à l'origine de la forme activatrice, Ciact, dont la nature précise reste à découvrir. Elle active les cibles de Hh: *wg* et/ou *dpp* et *ptc*. En rouge: protéines agissant comme antagonistes de Hh; en noir: protéines requises pour la transmission du signal Hh. Action positive: →; action négative: →̄. Cos: costal; Fu: fused; Sufu: supresseur de fused.

Le relais par *Cubitus interruptus*

A l'autre extrémité de la voie Hh, la réponse nucléaire induite par le signal est relayée par des facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines à doigts de Zinc de type Gli, tels que *Cubitus interruptus* (Ci) chez la drosophile. Ainsi, Ci apparaît comme nécessaire et suffisant pour induire l'expression des gènes cibles de Hh. En effet, la surexpression ectopique de Ci dans des cellules qui ne reçoivent pas le signal Hh induit l'expression ectopique de *ptc*, et de *wg* ou *dpp* selon qu'il s'agit de l'embryon ou du disque d'aile [18-20].

De manière surprenante, Ci apparaît être essentiellement cytoplasmique, y compris dans les cellules qui reçoivent Hh. Pendant longtemps, on a pensé que Hh réglait l'activité de Ci

en augmentant, au niveau post-transcriptionnel, son accumulation. Récemment, cette idée a été remise en question par la mise en évidence de la dualité du rôle de Ci: répresseur ou transactivateur suivant les cellules [21]. En effet, dans les cellules qui ne reçoivent pas Hh, la protéine cytoplasmique Ci subit une protéolyse qui conduit à une forme tronquée de 75 kDa (Ci-p75), déletée de sa partie carboxy-terminale, qui, contrairement à la forme longue de Ci, est présente dans le noyau. Ci-p75 paraît agir (*via* le domaine à doigts de zinc qui est toujours présent), comme un répresseur de la transcription des cibles de Hh (*figure 1*). Au contraire, dans les cellules recevant Hh, cette activité protéolytique est inhibée et la forme longue de Ci (155 kDa: Ci-p155), qui agirait comme un activateur de transcription, s'accumule. L'accumulation, en absence du signal Hh, de Ci-p155 dans les cellules mutantes pour *cos-2*, *ptc*, ou le gène de la PKA, indique que les produits respectifs de ces gènes interviennent dans le contrôle de la protéolyse de Ci. Récemment, une nouvelle protéine interagissant avec la voie Hh, Slimb, a été identifiée. Le fait que Slimb soit requis pour la protéolyse de Ci, ainsi que la présence d'une séquence (boîte F) caractéristique des protéines de la voie de la dégradation protéique par l'ubiquitination, suggèrent un rôle de Slimb dans le ciblage de Ci vers les protéasomes [22].

La nature exacte de la forme activée de Ci (Ci-act) n'est pas connue. En réponse à Hh, Ci-p155 cytoplasmique pourrait être modifiée en une forme nucléaire activatrice qui serait en quantité trop faible pour pouvoir être détectée. Une autre possibilité serait que les épitopes reconnus par les anticorps utilisés seraient masqués sur la protéine Ci-act. Enfin, il faut signaler que Ci-p155 (mais pas Ci-p75) a la capacité de se lier à une protéine régulatrice de la transcription, la *CREB binding protein* (CBP) (*m/s n° 10, vol. 11, p. 1113*), qui augmente, dans des cellules en culture, la transactivation par Ci. La protéine CBP pourrait donc agir *in vivo* comme un cofacteur de Ci-act [23].

Un complexe cytosolique lié aux microtubules

Par ailleurs, les relations moléculaires entre les différents composants cytosoliques de la voie Hedgehog commencent à être décryptées. Un complexe cytoplasmique de haut poids moléculaire, qui inclut au moins trois composants de la voie Hh, a été récemment identifié [24, 25]. Ce complexe réunit la sérine/thréonine-kinase Fu, dont la fonction est nécessaire à l'activation transcriptionnelle des cibles de Hh, la protéine Ci (du moins la forme p155), ainsi que Costal-2, une protéine apparentée aux kinésines, précédemment identifiée comme un régulateur négatif de la voie Hh [26, 27]. Ce complexe Fu/Cos-2/Ci est associé aux microtubules, vraisemblablement *via* la kinésine Cos-2. Lorsque des cellules en culture sont traitées par Hh, Fu et Cos2 deviennent phosphorylées et, plus important, le complexe se détache des microtubules [24, 28]. En revanche, l'association entre Fu et Cos-2 ne dépend pas de la présence de Hh.

Un autre partenaire de la voie Hh, Sufu, interagit simultanément avec Ci et Fu [29]. Sufu est une nouvelle protéine dont la fonction reste inconnue, mais qui, comme Cos2, semble agir comme un antagoniste de l'activité de la kinase Fu [30, 31]. En effet, la perte de fonction de Sufu (tout comme celle de Cos-2) peut corriger le phénotype dû à la perte de fonction de Fu, et accentue les effets dus à la perte de fonction de Cos-2, ce qui suggère que ces deux protéines agissent de manière coopérative. Il est probable que Sufu fait également partie du complexe de haut poids moléculaire Fu/Cos-2/Ci décrit ci-dessus.

Les questions suivantes...

Ces différentes observations révèlent donc trois effets du signal Hh: (1) il empêche la liaison au cytosquelette du complexe protéique constitué de la kinase Fu, du facteur de transcription Ci, de la kinésine Cos-2 et, vraisemblablement, de la protéine Sufu; (2) il diminue la formation de la forme répresseur de Ci; (3) il per-

met, ou favorise, l'apparition de la forme activatrice de Ci.

Comment peut-on relier entre eux ces différents événements? Trop d'éléments manquent actuellement pour élaborer un modèle précis (quelle est la forme activatrice de Ci? Est-elle présente dans le complexe? Quels sont les autres constituants du complexe?...). Cependant, il est vraisemblable que le complexe multiprotéique mis en évidence sert de site d'assemblage pour tous les composants qui règlent le clivage et les autres modifications de Ci nécessaires à son activité transactivatrice. En absence d'Hh, la liaison du complexe aux microtubules pourrait retenir la forme longue de Ci dans le cytoplasme, et elle faciliterait la protéolyse de Ci qui engendre sa forme répressive. En présence d'Hh, Cos-2 et Sufu seraient inactivés, vraisemblablement par la kinase Fu, et le complexe se détacherait des microtubules. La libération de la forme longue de Ci et son éventuelle modification en forme activatrice seraient alors favorisées. Quoi qu'il en soit, il est clair que la compréhension des mécanismes intimes de l'activation de Ci passe maintenant en priorité par la caractérisation des autres composants du complexe protéique, clé de voûte de la transmission du signal Hh ■

Pascal Théron

Chargé de recherches au Cnrs, UMR 6543-Cnrs, Centre de biochimie, Université de Nice, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex, France.

E-mail: therond@unice.fr

Claudie Lamour-Isnard

Professeur à l'Université Paris VII-Denis Diderot.

Laboratoire de génétique du développement et évolution, Institut Jacques-Monod, UMR 7592, Tour 43, 2, place Jussieu, 75231 Paris Cedex 05, France.

Anne Plessis

Maître de conférences à l'Université Paris VII-Denis Diderot.

Laboratoire de génétique du développement et évolution, Institut Jacques-Monod, UMR 7592, Tour 43, 2, place Jussieu, 75231 Paris Cedex 05, France.

RÉFÉRENCES

- Ingham PW. Signalling by hedgehog family proteins in *Drosophila* and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 492-8.
- Concordet J. Morphogenèse, acide rétinol... et Sonic Hedgehog. *Med Sci* 1994; 10: 570-3.
- Gorry P, Lacombe D, Concordet J. Nœvomatose baso-cellulaire et gène *patched*, un nouveau lien entre cancer et gènes du développement. *Med Sci* 1996; 12: 1105-8.
- Hooper J, Scott MP. The molecular genetic basis of positional information in insect segments. In: Hennig W, ed. *Results and problems in cell differentiation: early embryonic development of animals*. Berlin: Springer/Verlag, 1992; 18: 1-48.
- Basler K, Struhl G. Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by Hedgehog protein. *Nature* 1994; 368: 208-14.
- Capdevila J, Guerrero I. Targeted expression of the signalling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J* 1994; 13: 4459-68.
- Tabata T, Kornberg TB. Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal disks. *Cell* 1994; 76: 89-102.
- Zecca M, Basler K, Struhl G. Sequential organizing activities of *engrailed*, *hedgehog*, and *decapentaplegic* in the *Drosophila* wing. *Development* 1995; 121: 2265-78.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessel TM. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of Sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 1995; 81: 445-55.
- Fan CM, Porter JA, Chiang C, Chang DT, Beachy PA, Tessier-Lavigne M. Long-range sclerotome induction by Sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* 1995; 81: 457-65.
- Johnson E, Craig EN, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. *Sonic hedgehog* and *Fgf-4* act through a signalling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the *Drosophila* limb bud. *Cell* 1994; 79: 993-1003.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287: 795-801.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 1996; 384: 176-9.
- Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, et al. The tumour-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 1996; 384: 129-34.
- van den Heuvel M, Ingham PW. *smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for Hedgehog signalling. *Nature* 1996; 382: 547-51.
- Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M, Hooper JE. The *Drosophila smoothed* gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the Hedgehog signal. *Cell* 1996; 86: 221-32.
- Chen Y, Struhl G. Dual role for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 1996; 87: 553-63.
- Hepker J, Wang QT, Motzny CK, Holmgren R, Orenic TV. *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with *patched* and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development* 1997; 124: 549-58.
- Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of *hedgehog* target genes in *Drosophila* is mediated directly by the *Cubitus interruptus* protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* 1996; 10: 2003-13.
- Von Ohlen T, Lessing D, Nusse R, Hooper J. Hedgehog signaling regulates transcription through *Cubitus interruptus*, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2404-9.
- Aza-Blanc P, Ramirez-Weber FA, Laget MP, Kornberg TB. Proteolysis that can be inhibited by Hedgehog directs *Cubitus interruptus* protein to the nucleus and changes its activity as a transcriptional regulator. *Cell* 1997; 89: 1043-53.
- Jiang J, Struhl G. Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 1998; 391: 493-6.
- Akimaru H, Chen Y, Dai P, Hou DX, Nonaka M, Smolik SM, Armstrong S, Goodman RH, Ishii S. *Drosophila* CBP is coactivator of *Cubitus interruptus* in Hedgehog signalling. *Nature* 1997; 386: 735-8.
- Robbins DJ, Nybakken KE, Kobayashi R, Sisson JC, Bishop JM, Théron P. Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein Costal-2. *Cell* 1997; 90: 225-34.
- Sisson JC, HO KS, Suyama K, Scott MP. Costal-2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 1997; 90: 235-45.
- Préat T, Théron P, Limbourg-Bouchon B, Pham A, Tricoire H, Busson D, Lamour-Isnard C. Segmental polarity in *Drosophila melanogaster*: genetic dissection of *fused* in a *Suppressor of fused* background reveals interaction with *costal-2*. *Genetics* 1993; 135: 1047-62.
- Forbes AJ, Nakano, Y, Taylor AM, Ingham PW. Genetic analysis of *hedgehog* signalling in the *Drosophila* embryo. *Development* 1993; (suppl) 115-24.
- Théron P, Knight J D, Kornberg TB, Bishop J M. Phosphorylation of the fused protein kinase in response to signalling from hedgehog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4224-8.
- Monnier V, Dussilol F, Alvès G, Lamour-Isnard C, Plessis A. Suppressor of fused links Fused and Cubitus Interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* 1998 (sous presse).
- Préat T. Characterization of *Suppressor of fused*, a complete suppressor of the *fused* segment polarity gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1992; 132: 725-36.
- Pham A, Théron P, Alves G, Blanchet-Tournier F, Busson D, Lamour-Isnard C, Limbourg-Bouchon B, Préat T, Tricoire H. The *Suppressor of fused* gene encodes a novel PEST protein involved in *Drosophila* segment polarity establishment. *Genetics* 1995; 140: 587-98.

TIRÉS À PART

P. Théron.



RETROUVEZ LES REVUES MASSON SUR INTERNET

<http://www.masson.fr>
e-mail : revues@masson.fr