médecine/sciences 1997 ; 13 : 222-4

Biologie du développement

Des récepteurs pour les protéines de signalisation de la famille Wnt, enfin ?

Les protéines Wnt sont parmi les plus célèbres des protéines de communication cellulaire. Paradoxalement, jusqu'à tout récemment, on ignorait tout de leurs récepteurs. Cette lacune vient d'être comblée, par un aller-retour de la génétique de la drosophile à la biologie des vertébrés.

wingless et la famille *Wnt*

L'acronyme *Wnt* est une contraction des noms des deux premiers gènes connus de la famille, l'un, *wingless (wg)*, chez la drosophile, l'autre étant le proto-oncogène de vertébré *int-1* (pour *mouse mammary tumor virus integration site*) [1]. Très vite, on s'est rendu compte que, si *int-1*, rebaptisé *Wnt-1*, est bien l'orthologue* de *wg*, il n'existait pas un seul gène et une seule protéine Wnt, mais toute une famille de protéines voisines, toutes impliquées dans la signalisation cellulaire. On peut ainsi dénombrer chez les vertébrés plus de dix protéines Wnt différentes correspondant à autant de gènes paralogues** [2]. Chez la drosophile on a pu mettre en évidence à ce jour quatre gènes *Dwnt* [3]. La correspondance (orthologie) de ces gènes *Dwnt* avec certains types précis des gènes *Wnt* des vertébrés indique que la diversification de ces gènes remonte au moins à l'origine des Cœlomates, à plus de 550 millions d'années [2].

Les gènes *Wnt* des mammifères, outre leur pouvoir transformant, ont été impliqués dans toute une panoplie d'effets au cours du développement et de la différenciation, comme la spécification régionale du système nerveux antérieur [4, 5], le développement des membres [6], l'induction du mésoderme et la formation des axes embryonnaires [7]. Le gène *wingless* de la drosophile code pour une protéine sécrétée, impliquée dans la communication cellulaire. Il fait partie des gènes de polarité segmentaire qui interviennent au cours de l'embryogenèse précoce dans la formation des segments et la détermination, dans chaque segment, des deux compartiments antérieur et postérieur. Comme son nom l'indique, *wg* intervient aussi lors de la seconde morphogenèse chez la drosophile, au cours de la métamorphose, en particulier dans la formation de l'aile.

L'analyse génétique des partenaires de *wg* chez la drosophile, particulièrement au cours du développement embryonnaire, a contribué de manière importante à élucider la cascade de transmission en aval du signal Wg [8], remarquablement conservée chez les mammifères : la plupart des éléments connus de la cascade chez les mammifères ont leur homologue déterminé chez la drosophile et réciproquement *(figure 1)* [9, 10]. Toutefois, jusqu'à une date très récente, un élément-clé de cette cascade restait inconnu : les récepteurs des protéines Wnt eux-mêmes ! La découverte de ces récepteurs s'est faite de manière inattendue, à la suite d'un remarquable aller et retour de la génétique de la drosophile à celle des vertébrés.

Le gène *frizzled* et la polarité de tissu

Chez la drosophile, *frizzled (fz)* est un gène dit de « polarité tissulaire » [11]. Il affecte les organes sensoriels périphériques (petites soies ou microchètes, grandes soies ou macrochètes) d'une façon particulière : ni la formation, ni le nombre, ni la forme de ces soies ne sont affectés dans les mutants *fz* ; seule est touchée leur orientation qui devient désordonnée, d'où un aspect crépu *(frizzled)*. Cette orientation des soies met en évidence l'existence d'une polarité à l'intérieur d'un tissu, déterminée génétiquement. Cette polarité tissulaire est distincte de la « polarité segmentaire » mais, de manière surprenante, ces deux phénomènes, différents par bien des aspects, reposent sur des mécanismes moléculaires en partie communs. L'analyse génétique a montré que *fz* possédait une double fonction : une fonction extracellulaire de communication qui permet de transmettre le signal d'orientation d'une cellule à l'autre, et une fonction intracellulaire de transmission du signal qui permet de faire connaître à chaque cellule la nature de ce signal [12, 13]. En accord avec les données génétiques, l'analyse moléculaire a montré que la protéine Fz présente un domaine extracellulaire riche en cystéines et sept domaines hydrophobes transmembranaires. Toutefois, sa séquence la distinguait clairement du type des récepteurs à sept domaines transmembranaires liés aux protéines G.

Certains éléments de la cascade de transmission du signal sont communs aux deux voies Wg et Fz, comme la protéine intracellulaire Dishevelled (Dsh) [9, 14]. Cependant, Fz pouvait difficilement être le récepteur de Wg car l'analyse génétique montre que *fz*, contrairement à *wg*, n'a pas de fonction essentielle au cours de l'embryogenèse. Toutefois, il n'est pas exclu que *fz* puisse avoir une fonction

* *Orthologue : gènes fonctionnellement équivalents, homologues dans différentes espèces.*

** *Paralogue : gènes d'une même famille et intervenant dans des fonctions voisines au sein d'une même espèce. Par exemple, les mêmes gènes* Hox *appartenant à des* clusters Hox *équivalents dans différentes espèces sont orthologues ; deux gènes* Hox *équivalents dans deux* clusters *différents sont paralogues.*

embryonnaire. En effet, des transcrits de *fz*, probablement d'origine maternelle, sont présents dans l'embryon [12]. L'absence de létalité embryonnaire des mutants *fz* pourrait être due, soit à la présence de ces transcrits maternels, soit à la redondance, aujourd'hui connue, des gènes de la famille *fz* chez la drosophile.

Le gène *fz*, prototype d'une nouvelle famille

En 1992, Chan *et al.* [15] découvraient par hasard deux homologues de *frizzled* chez le rat, où ils sont exprimés dans une grande variété de tissus. Plus récemment, l'équipe de Jeremy Nathans (Baltimore, Maryland, USA) [16] a recherché systématiquement des homologues de *fz* dans différents organismes. Pas moins de huit gènes paralogues différents ont été identifiés chez les mammifères (rat, souris, homme) et jusqu'à onze gènes chez le poisson-zèbre *Danio rerio*. Deux membres de la famille, plus divergents, ont été découverts chez le nématode *C. elegans* [16, 17]. De manière plus étonnante encore, un nouveau gène *fz*, nommé *Dfz2*, a été découvert chez la drosophile. Ce dernier est plus proche des gènes *fz5* humain et *fz8* murin qu'il ne l'est du gène *frizzled* original, indiquant ainsi l'origine très ancienne des duplications de ces gènes [16]. Cette nouvelle famille de récepteurs présente donc une extraordinaire diversité. Dans le cas le plus simple où il y aurait un ligand par récepteur, cela implique l'idée d'une famille de ligands apparentés. Sur cette base, Jeremy Nathans et son équipe ont proposé l'hypothèse selon laquelle la famille Fz correspondrait aux récepteurs recherchés de la famille Wnt.

Les protéines Fz sont bien les récepteurs des protéines Wnt

Deux équipes ont apporté des arguments forts à l'appui de cette hypothèse. L'équipe de Randall T. Moon, (Seattle, Washington, USA) [18], a utilisé des explants du pôle animal de xénope. Dans ces explants, qui répondent normalement au signal Wnt, les interactions cellulaires sont respectées. L'injection d'un ADN de rat *Rfz1* recrute la protéine Xwnt8 à la surface des cellules, mais pas la protéine Xwnt5. L'injection de l'ADNc de *Xwnt8* provoque l'induction de deux gènes caractéristiques de xénope, *Xnr3* et *siamois*. L'injection de *Rfz1* provoque le même effet, et l'injection simultanée des deux ADNc montre une forte synergie. En accord avec ce qui est connu de la cascade de transmission du signal Wnt chez la drosophile et chez les vertébrés *(figure 1)*, l'injection de l'ADNc du gène *Xgsk3*, homologue du gène de drosophile codant pour la sérine-thréonine kinase Shaggy/Zeste-white 3 (Sgg/Zw3) a un effet inhibiteur sur cette induction. L'équipe de Jeremy Nathans, associée à celle de Roel Nusse (Stanford, Californie, USA) a étudié l'interaction Fz-Wg chez la drosophile [19].
Des cellules en culture, transfectées par un ADN permettant l'expression de *Dfz2*, acquièrent la capacité de

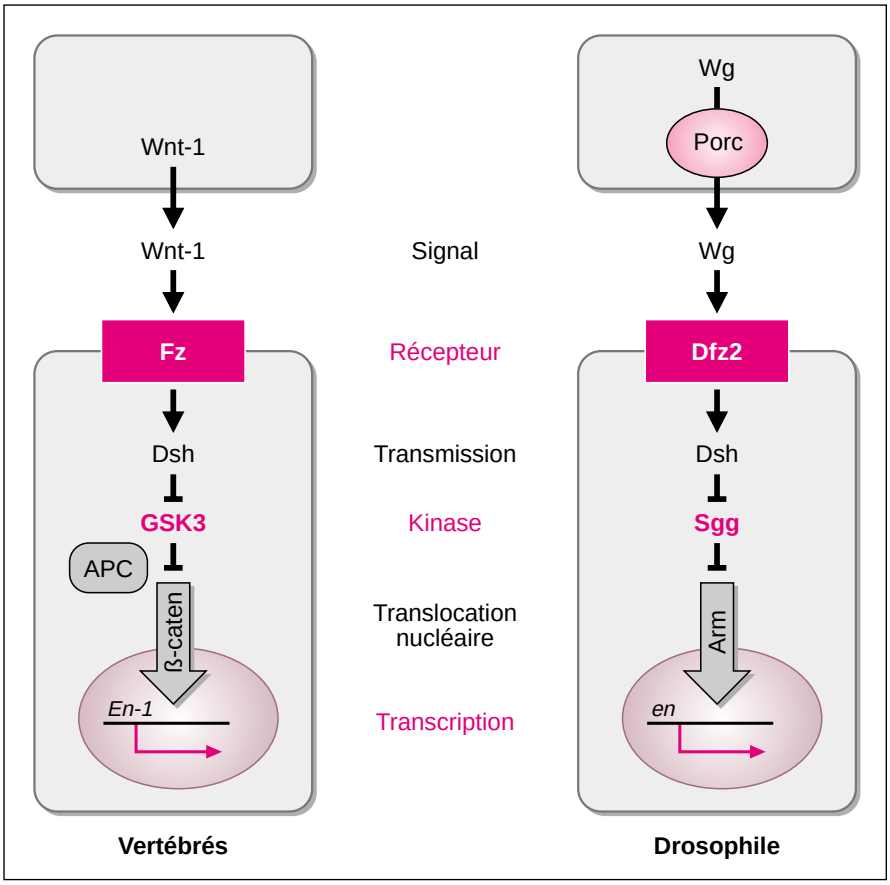

Figure 1. ***Les cascades de la signalisation* Wnt-1 *chez les vertébrés et* wingless *chez la drosophile sont représentées en parallèle.*** *La plupart des éléments aujourd'hui identifiés sont homologues : Dsh (Dishevelled) est commune à ces organismes, la glycogène-synthase-kinase-3 (GSK3) est l'homologue de la kinase Shaggy (Sgg) (aussi appelée Zeste-white 3, Zw3) chez la drosophile et la protéine Armadillo de la drosophile est l'homologue des β-caténines des vertébrés. En revanche, on ne connaît pas encore chez la drosophile l'homologue de la protéine associée à la polypose adénomateuse du côlon (*adenomatous polyposis coli, *APC) dont on a montré chez les vertébrés qu'elle forme un complexe avec les protéines GSK3 et β-caténine [9]. Porc : Porcupine, protéine impliquée dans l'excrétion de la protéine signal Wingless (Wg) [20].* en : engrailed, *gène de polarité segmentaire dont la transcription répond au signal Wg à certains stades du développement embryonnaire de la drosophile.* En-1 : Engrailed-1, *son homologue chez la souris, impliqué dans la régionalisation du système nerveux central.*

répondre au signal Wg. Cette réponse a été suivie par l'augmentation de la quantité de la forme hypophosporylée de la protéine Armadillo (β-caténine), caractéristique de la réponse à Wg en aval de la cascade [9] *(figure 1)*. Plus directement encore, les cellules transfectées accumulent la protéine Wg à leur surface. Cette accumulation se produit lorsque seul le domaine extracellulaire riche en cystéines de DFz2 est ancré dans la membrane des cellules.

Le gène *Dfz2*, contrairement à son frère *frizzled* exprimé principalement pendant le stade pupal, est exprimé de manière prépondérante au cours de l'embryogenèse. Plus particulièrement, il s'exprime de façon ubiquiste en début d'embryogenèse, puis présente, au stade de la bandelette germinative étendue, le profil d'expression en 15 bandes caractéristique des gènes de polarité segmentaire. Il serait particulièrement intéressant de savoir si ces bandes correspondent aux cellules qui expriment *wg* au même stade, ou aux cellules voisines, qui expriment *engrailed (en)*. La recherche de mutants de *Dfz2* devrait permettre de déterminer si l'expression précoce ubiquiste de ce gène est fonctionnelle, et correspond alors à d'autres fonctions que celles impliquées dans la cascade de signalisation Wingless. L'analyse génétique permettra aussi d'éclairer le mécanisme de l'expression en bandes de *Dfz2*, plus tardive que celle d'*en* ou de *wg* : *Dfz2* est-il sous le contrôle des autres gènes de polarité segmentaire ?

Dans les expériences de transfection, *Dfz2* peut être remplacé par les gènes humain *Hfz5* et murins *Mfz4, 7* et *8*. En revanche, les protéines Mfz3 et Mfz6 ne permettent pas la fixation de la protéine Wg. En outre, la protéine Mfz4, tronquée de son domaine extracellulaire riche en cystéines est inactive.

Conclusion

La découverte que les protéines Fz sont les récepteurs des protéines Wnt est le résultat de la coopération fructueuse entre des approches biochimiques et des approches génétiques, menées en parallèle chez la drosophile, le nématode et les vertébrés.

De nombreux points restent cependant à éclaircir. Parmi ceux-ci, peut-être le plus intéressant est-il celui de la spécificité du système : y a-t-il un récepteur Fz donné par molécule signal Wnt ou bien y-a-t-il redondance fonctionnelle, et dans quelle mesure ? A nouveau, l'analyse génétique chez la drosophile peut être particulièrement éclairante. Si Dfz2 est bien le seul récepteur de Wg, alors les mutations du gène, quand on les obtiendra, devraient provoquer le même phénotype de polarité segmentaire que les mutations *wingless*. Par ailleurs, on s'attend à ce que le ligand du récepteur Fz prototype soit l'une des molécules de la famille Dwnt dont quatre sont connues actuellement.

Un second point est celui de la cascade de transmission du signal en aval. Une cascade différente correspond-elle à chaque signal Wnt ? Nous avons vu que la protéine Dsh est commune aux voies Wg-Dfz2 et Fz. Cependant il ne semble pas que dans la voie Fz, au stade pupal, les protéines Zw3/Sgg et Arm soient impliquées. La recherche du mécanisme de la spécificité des voies de transmission du signal n'est pas terminée ■

RÉFÉRENCES

1. Nusse R, Varmus HE. *Wnt genes. Cell* 1992 ; 69 : 1073-87.

2 Sidow A. Diversification of the *Wnt* gene family on the ancestral lineage of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5098-102.

3. Graba Y, Gieseler K, Aragnol D, *et al.* DWnt-4, a novel *Drosophila Wnt* gene acts downstream of homeotic complex genes in the visceral mesoderm. *Development* 1995 ; 121 : 209-18.

4. Bally-Cuif L, Wassef M. Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo. *Curr Op Genet Dev* 1995 ; 5 : 450-8.

5. Joyner AL. *Engrailed, Wnt* and *Pax* genes regulate midbrain hindbrain development. *Trends Genet* 1996 ; 12 : 15-20.

6. Cohn MJ, Tickle C. Limbs : a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet* 1996 ; 12 : 253-7.

7. Boucaut JC, Umbhauer M, Riou JF. L'induction du mésoderme. *Med Sci* 1994 ; 10 : 854-67.

8. Bellaïche Y, Perrimon N. La voie de signalisation Wingless chez la drosophile. *Med Sci* 1997 ; 13 : 166-74.

9. Romagnolo B. APC : de nouveaux partenaires, de nouveaux indices. *Med Sci* 1996 ; 12 : 1109-10.

10. Danielian PS, McMahon AP. *Engrailed-1* as a target of the *Wnt-1* signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* 1996 ; 383 : 332-4.

11. Gubb D. Genes controlling cellular polarity in *Drosophila*. *Development* 1993 (suppl) : 269-77.

12. Adler PN, Vinson C, Park WJ, Conover S, Klein L. Molecular structure of *frizzled*, a Drosophila tissue polarity gene. *Genetics* 1990 ; 126 : 401-16.

13. Vinson CR, Conover S, Adler PN. A Drosophila tissue polarity locus encodes a protein containing seven potential transmembrane domains. *Nature* 1989 ; 338 : 263-4.

14. Krasnow RE, Wong LL, Adler PN. *Dishevelled* is a component of the *frizzled* signaling pathway in *Drosophila*. *Development* 1995 ; 121 : 4095-102.

15. Chan SDH, Karpf DB, Fowlkes ME, *et al.* Two homologs of the *Drosophila* polarity gene *frizzled (fz)* are widely expressed in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 25202-7.

16. Wang Y, Macke JP, Abella BS, *et al.* A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the *Drosophila* tissue polarity gene *frizzled*. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 4468-76.

17. Sawa H, Lobel L, Horvitz R. The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-17*, which is required for certain asymmetric cell divisiions, encodes a putative seven-transmembrane protein similar to the *Drosophila* Frizzled protein. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 2189-97.

18. Yang-Snyder J, Miller JR, Brown JD, Lai CJ, Moon RT. A *frizzled* homolog functions in a vertebrate *Wnt* signaling pathway. *Curr Biol* 1996 ; 6 : 1302-6.

19. Bhanot P, Brink M, Samos CH, *et al.* A new member of the *frizzled* family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996 ; 382 : 225-30.

20. Kodawaki T, Wilder E, Klingensmith J, Zachary K, Perrimon N. The segment polarity gene *porcupine* encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 3116-28.

Jean Deutsch
Professeur à l'Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris 6, Laboratoire « Évolution Moléculaire », Bâtiment B, 9, quai Saint-Bernard, case 241, 75252 Paris Cedex 05, France.

Denise Busson
Professeur à l'Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris 6, Laboratoire « Développement et Évolution », Institut Jacques-Monod, Cnrs et Université Denis-Diderot, Paris 7, 2, place Jussieu, Tour 43, 75251 Paris Cedex 05, France.

TIRÉS À PART

J. Deutsch.