

Cholestérol et maturation autoprotéolytique des protéines Hedgehog !

Suite à une série de travaux remarquables, il apparaît que les protéines de la famille Hedgehog font l'objet d'une maturation post-traductionnelle inédite par autoprotéolyse couplée à l'addition de... cholestérol ! Et de manière étonnante, cette nouvelle fonction biologique du cholestérol dans la maturation protéique a permis de proposer que les multiples malformations congénitales du syndrome de Smith-Lemli-Opitz caractérisé par l'absence de cholestérol endogène sont la conséquence de la perte du signal extracellulaire Sonic Hedgehog au cours du développement embryonnaire (*m/s* n° 3, vol. 11, p. 470).

Autoprotéolyse des protéines de la famille Hedgehog

La caractérisation biochimique des protéines Hedgehog est à mettre entièrement au crédit du groupe de Phil Beachy à Baltimore (MD, USA). Dans les premières expériences de traduction *in vitro* de l'ARNm du gène *Hedgehog*, deux peptides de 24 et 19 kDa ont été obtenus en plus du peptide de 44 kDa attendu d'après la séquence codante [1]. Ces deux peptides sont le résultat du clivage protéolytique du produit primaire de traduction du gène *Hedgehog*. La première surprise est venue quand ce groupe a montré que le clivage est autocatalytique. Le produit primaire de traduction purifié à homogénéité donne naissance aux deux peptides après renaturation en présence de dithiothréitol ou de β -mercaptoéthanol, deux réducteurs et protecteurs des groupes SH [2]. De plus, la partie carboxyterminale de la séquence des protéines Hedgehog comporte

un motif de type sérine protéase indispensable à l'autoprotéolyse *in vitro* comme *in vivo*. C'est donc dans cette partie que réside l'activité autocatalytique. Mais quel est donc le rôle des deux peptides, Hh-N contenant l'extrémité aminoterminal de Hedgehog et Hh-C contenant l'extrémité carboxyterminale, dans l'activité biologique du gène *Hedgehog* ?

Le peptide Hh-N est couplé à un lipide

La détermination rigoureuse du site de clivage par séquençage de l'extrémité N-terminale du peptide Hh-C a permis de répondre à cette question. Des ADNc codant pour l'un ou l'autre des produits de clivage Hh-N et Hh-C ont ainsi pu être fabriqués, ce qui a permis de tester l'activité de chacun d'eux synthétisés isolément. L'ADNc codant pour Hh-C est incapable de remplacer l'ADNc de *Hedgehog*. Le seul rôle connu de Hh-C est donc de permettre l'autoprotéolyse. Hh-N, en revanche, remplit toutes les fonctions biologiques de Hedgehog [3].

Lors de ces expériences, on a observé d'importantes différences entre les peptides Hh-N produits par autoprotéolyse ou à partir de l'ADNc spécifique. En particulier, leurs localisations diffèrent dans des cellules en culture : Hh-N produit par la voie autoprotéolytique naturelle est sécrété mais reste localisé à la surface cellulaire tandis que, produit artificiellement à partir de l'ADNc spécifique, Hh-N est retrouvé majoritairement dans le milieu de culture. Dans les tests fonctionnels *in vivo*, Hh-N synthétisé à partir de l'ADNc spécifique a aussi des effets plus marqués

qui pourraient provenir de sa diffusion à plus grande distance des cellules sécrétrices.

Couplage du cholestérol au cours de l'autoprotéolyse des protéines Hedgehog

La nature moléculaire de la différence entre les deux peptides a été élucidée grâce à une analyse minutieuse du mécanisme réactionnel de l'autoprotéolyse montrant qu'il fait intervenir une lipitation [4]. L'autoprotéolyse aurait lieu en deux étapes : tout d'abord, transformation de la liaison peptidique entre les parties N- et C-terminales (Hh-N et Hh-C) en une liaison thioester, puis clivage de cette liaison extrêmement réactive et couplage d'un lipide à Hh-N (*figure 1*). Ainsi, les propriétés du peptide Hh-N obtenu à partir d'un ADNc spécifique s'expliquent par le fait qu'il n'est pas couplé à ce lipide au cours de sa synthèse.

Après la découverte de l'autoprotéolyse, la deuxième surprise a donc été l'entrée en scène du cholestérol, une molécule au répertoire déjà bien rempli [5]. Il a été identifié au lipide couplé à Hh-N au cours de l'autoprotéolyse de la manière suivante. *In vitro*, l'ajout d'extraits lipidiques de cellules de drosophile permet de stimuler l'autoprotéolyse de la protéine primaire purifiée à homogénéité en absence de dithiothréitol et le lipide actif dans ces extraits présente un profil chromatographique identique au cholestérol. Enfin, du cholestérol radiomarqué est effectivement retrouvé couplé aux protéines Hedgehog après incorporation dans des cellules en culture.

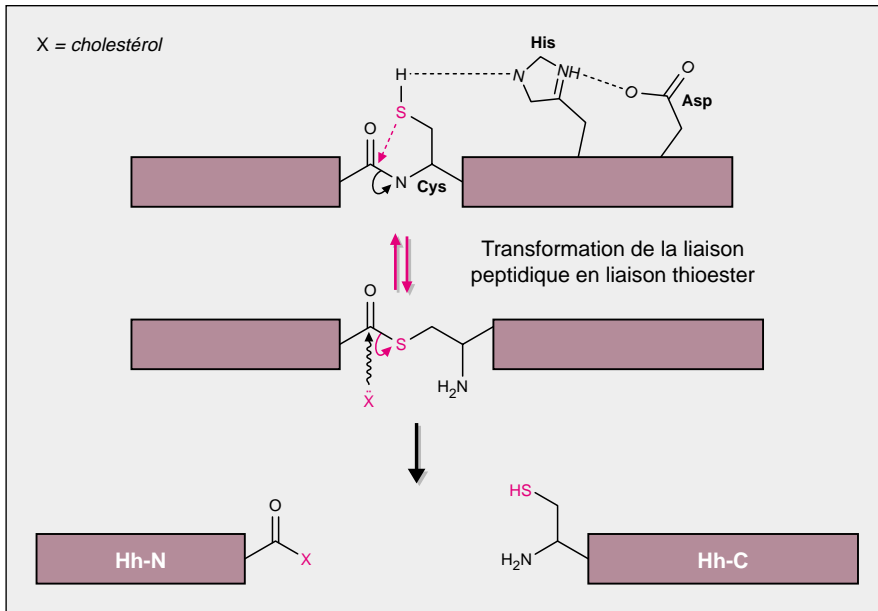


Figure 1. **Maturation post-traductionnelle des protéines de la famille Hh.** Le produit de traduction primaire du gène *Hedgehog* donne naissance à deux peptides par autotprotéolyse. Le peptide dérivé de la partie aminotermine est couplé au cholestérol au cours de l'autotprotéolyse et il est responsable de toutes les activités de signalisation intercellulaire du gène *Hedgehog*. La maturation post-traductionnelle comporte deux étapes: une élimination classique du peptide signal situé à l'extrémité aminotermine et une autotprotéolyse couplée à l'addition de cholestérol. Le mécanisme proposé pour l'autotprotéolyse est le suivant: la liaison peptidique entre les parties N- et C-terminales (Hh-N et Hh-C) est transformée en une liaison thioester par interaction avec les acides aminés indiqués au cours d'un repliement intramoléculaire. Cette liaison, extrêmement réactive, subit une attaque nucléophile par le cholestérol qui est alors couplé à la partie N-terminale lors de la dissociation entre les peptides situés de part et d'autre de la liaison thioester. In vitro, d'autres réactifs nucléophiles, tels que le dithiothréitol ou des petits peptides comportant une cystéine en position N-terminale, peuvent participer à la réaction. (D'après [4].)

Une famille de protéines ancrées à la membrane cellulaire par le cholestérol?

Le couplage au cholestérol pourrait bien être commun à d'autres protéines sécrétées [4, 5]. Dans des cellules de mammifères, il apparaît que le cholestérol est incorporé à des protéines *Hedgehog* synthétisées à partir de vecteur d'expression mais aussi à des protéines endogènes qui semblent ne pas appartenir à la famille *Hedgehog*. Par ailleurs, le groupe de Phil Beachy a également démontré l'existence d'une famille de protéines du nématode *C. elegans*

qui possèdent une analogie de séquence avec les protéines *Hedgehog* dans leur partie C-terminale et qui sont effectivement capables de s'autotprotéolyser. Il est possible que, là aussi, le cholestérol soit le lipide participant à l'étape finale de l'autotprotéolyse.

L'autotprotéolyse avec couplage au cholestérol constitue une maturation post-traductionnelle qui s'ajoute donc aux autres cas de lipidation connus: farnésylation, prénylation, palmitoylation et ancrage GPI [6]. La comparaison des protéines Hh-N, produites par autotprotéolyse ou à partir d'un ADNc spécifique, suggère

que, du fait de cette dernière modification, le couplage du cholestérol ancre le peptide concerné à la membrane cellulaire. De nombreuses questions restent à résoudre pour mieux comprendre l'importance de cette modification. Par exemple, dans quel compartiment cellulaire le couplage a-t-il lieu? Quelles sont les structures membranaires ponctiformes dans lesquelles Hh-N est détecté à la surface baso-latérale de l'épiderme de la larve de drosophile? Quels sont les chemins du trafic cellulaire de Hh-N? Hh-N est-il toujours couplé au cholestérol lors de sa propagation à distance des cellules sécrétrices?

Du cholestérol, pas trop mais assez tout de même...

Dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, de multiples malformations apparaissent au cours du développement embryonnaire: microcéphalie, hypotélorisme, agénésie pituitaire, et défauts de nombreux organes (reins...). L'anomalie génétique entraîne une forte diminution des taux de cholestérol par défaut de la 7-déhydrocholestérol-D7-réductase qui catalyse la dernière étape de la production endogène de cholestérol (*m/s n°3, vol. 11, p. 470*). Les fonctions « classiques » du cholestérol comme précurseur des hormones stéroïdes et des sels biliaires rendent difficilement compte des aspects spécifiques du syndrome. Phil Beachy et ses collaborateurs proposent désormais que l'absence de synthèse de cholestérol endogène affecte la synthèse de protéines nécessitant une autotprotéolyse avec couplage de cholestérol et, au premier chef, Sonic *Hedgehog* dont le rôle essentiel au cours du développement embryonnaire est maintenant bien établi. En effet, chez des souris dépourvues du gène *Sonic Hedgehog* par recombinaison homologue, l'absence du signal intercellulaire Sonic *Hedgehog* conduit à de multiples anomalies dont une holoprosencéphalie sévère qui rappelle les malformations crâniennes observées dans le syndrome de Smith-Lemli-Opitz [7]. De plus, les effets tératogènes d'inhibiteurs de la synthèse du cholestérol ont été

caractérisés de longue date par C.H.Roux [8] et les ressemblances phénotypiques entre les souris *Sonic Hedgehog*^{-/-} et des embryons de rats traités avec des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol sont également frappantes, renforçant encore l'hypothèse avancée par Phil Beachy.

J.P.C.

1. Lee JJ, von Kessler DP, Parks S, Beachy PA. Secretion and localized transcription suggest a role in positional signalling for products of the segmentation gene *Hedgehog*. *Cell* 1992; 71: 33-50.
2. Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 1994; 266: 1528-37.
3. Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 1995; 374: 363-6.
4. Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, Beachy PA. Hedgehog patterning

- activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 1996; 86: 21-34.
5. Porter JA, Young KE, Beachy PA. Cholesterol modification of Hedgehog signalling proteins during animal development. *Science* 1996; 274: 255-9.
 6. Pouliot JF, Béliveau R. Modifications post-traductionnelles des protéines par les lipides. *Med Sci* 1994; 10: 65-73.
 7. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corcoran JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature* 1996; 383: 407-13.
 8. Roux CH. Action tératogène du tripanolol chez l'animal. *Arch Fr Pédiatr* 1996; 21: 461-4.

FLASH

Isolement du gène responsable du syndrome branchio-oto-rénal et identification d'une nouvelle famille de gènes impliqués dans le développement

Le syndrome branchio-oto-rénal associe des anomalies branchiales, otiques et rénales. Il se transmet sur un mode autosomique dominant, avec une pénétrance et une expressivité variables. L'atteinte rénale est tantôt très sévère, voire non viable (aplasié bilatérale), tantôt modérée, ou même indétectable (syndrome oto-branchial). L'atteinte auditive est également variable; toutefois on estime que ce syndrome rend compte de 2 % des surdités congénitales profondes.

Les signes cliniques de ce syndrome évoquent une anomalie précoce du développement embryonnaire ou fœtal, entre la quatrième et la dixième semaine. Les kystes et fistules latéro-cervicaux traduisent la persistance des poches épiblastiques des deuxième, troisième et quatrième arcs branchiaux, qui normalement disparaissent à la fin de la sixième semaine. Les atteintes qui concernent les trois compartiments de l'oreille (externe, moyen et interne) traduisent la défaillance de processus morphogénétiques se produisant durant la même période. Enfin, les malformations du rein et du système collecteur (uretère absent ou bifide; pelvis surnuméraire ou bifide, distorsion des calices) sont indicatives d'un défaut de l'induction réciproque entre le blastème métanéphrogène et le bourgeon urétéral, qui débute à la cinquième semaine.

La maladie semble impliquer un gène unique, situé sur le bras long du chromosome 8 (région 8q13.3). L'analyse

génétique de plusieurs familles atteintes et l'étude d'un réarrangement chromosomique observé chez un patient [1] nous avaient permis de localiser ce gène dans un intervalle de 500 kb [2]. Par une démarche de clonage positionnel, s'appuyant sur la détermination de la séquence nucléotidique d'un intervalle génomique d'environ 100 kb, le gène vient d'être identifié [3]. Il coderait pour une protéine de 559 acides aminés, homologue de celle codée par le gène de développement *eya* de drosophile, déficient chez les mutants *eyes absent* [4]. En particulier, ces deux protéines partagent, à leur extrémité C-terminale, une région de 271 acides aminés extrêmement conservée.

Le gène responsable de la maladie humaine, que nous avons appelé *EYA1* en référence au gène *eya* de la drosophile, s'exprime dans la placode otique, puis ultérieurement dans les neuro-épithéliums cochléaire et vestibulaire, ainsi que dans la capsule otique et le mésenchyme de l'oreille moyenne. L'expression attendue dans les arcs branchiaux, sans doute faible et/ou très transitoire, n'a pu être décelée. Dans le métanéphros, l'expression du gène est restreinte aux cellules mésenchymateuses du cortex, et sa progression vers la périphérie du parenchyme rénal accompagne celle de la division dichotomique des branches urétérales. Les cellules qui expriment *EYA1* sont celles qui, sous l'effet inductif de la branche de division urétérale, se sont condensées et subiront ultérieurement une transformation épithéliale pour former le tubule et la capsule de Bowman du néphron. Les propriétés de la protéine codée par le gène *EYA1*, ainsi que son rôle précis dans le développement de

l'oreille et du rein, et dans la fermeture des arcs branchiaux, restent à définir. Nous avons identifié deux autres gènes homologues au gène *EYA1*, codant pour des protéines caractérisées par leur région C-terminale très semblable. Il est probable que les gènes de cette famille *EYA* nouvellement identifiée interviennent également dans le développement. La protéine de drosophile codée par le gène *eya* a une localisation nucléaire [4], et les produits des gènes *EYA* pourraient donc être des facteurs de transcription. L'analyse du phénotype des divers mutants *eya* de drosophile, caractérisés par une réduction ou une absence de l'œil adulte, a conduit à proposer un rôle de ce gène dans la survie des cellules progénitrices de l'œil [4]. Par analogie, on peut s'interroger sur une implication des protéines de la famille *EYA* dans l'échappement à l'apoptose qui touche nombre de cellules au sein des organes en formation.

Christine Petit

1. Vincent C, Kalatzis V, Compain S, Levilliers J, Slim R, Graia F, Pereira ML, Nivelon A, Croquette M-F, Lacombe D, Vigneron J, Helias J, Broyer M, Callen D-F, Haan E-A, Weissenbach J, Lacroix B, Bellani-Chantelot C, Le Paslier D, Cohen D, Petit C. A proposed new contiguous gene syndrome on 8q consists of branchio-oto-renal (BOR) syndrome, Duane syndrome, a dominant form of hydrocephalus and trapeze aplasia; implications for the mapping of the BOR gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1859-66.

2. Kalatzis V, Abdelhak S, Compain S, Vincent C, Petit C. Characterisation of a translocation-associated deletion defines the candidate region for the gene responsible for branchio-oto-renal syndrome. *Genomics* 1996; 34: 422-5.

3. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Well D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bededer P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C. A human homologue of the drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nature Genet* 1997; 15: 157-64.

4. Bonini NM, Leiserson WM, Benze S. The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing drosophila eye. *Cell* 1993; 72: 379-85