

L'absence de clavicule dans la dysplasie cléido-crânienne : un détail révélateur... d'un important facteur de l'ostéogenèse

Connaissez-vous la « tête d'Arnold » ? C'est sous ce titre que fut décrite la dysmorphie faciale des descendants d'un chinois, prénommé Arnold, qui, après avoir débarqué en Afrique du Sud en 1896, embrassa la religion musulmane, prit sept femmes et eut beaucoup d'enfants [1].

Dans une revue récente sur sa descendance (plus de mille personnes furent dénombrées et nombreuses sont celles ayant hérité le faciès du père fondateur), une analyse de ségrégation permit de localiser en 6p21 le locus de cette maladie héréditaire transmise en dominance : la dysplasie cléido-crânienne [2]. D'aucuns [3] prétendent même que Thersite, l'insolent soldat achéen décrit par Homère dans l'Illiade : « le plus laid qui soit venu sous Troie, avec ses épaules creuses surmontées d'une tête pointue au crâne saillant » était, lui aussi, atteint de dysplasie cléido-crânienne. Cette maladie généralisée du squelette, caractérisée par une petite taille, un thorax étroit, une hypoplasie des ailes iliaques, une absence d'ossification de l'os hyoïde, des dents surnuméraires (dont le nombre peut atteindre 60!), est d'un diagnostic facile en raison d'un signe constant et caractéristique : l'absence de clavicules qui permet aux malades de replier leurs épaules vers l'avant en les joignant l'une contre l'autre.

Depuis dix ans, le modèle animal était connu (Ccd pour *cleido-cranial dysplasia*) : par mutation radio-induite, une dysplasie osseuse en tout point analogue avait été observée chez la souris, dont le locus se trouvait sur le chromosome 17, en une région synténique du bras court du chromosome 6 humain [4]. A l'état homozygote, la mutation est létale chez les souriceaux nouveau-nés par incapacité de respirer.

Or, voici que simultanément quatre publications, procédant de démarches

différentes, viennent de parvenir à la découverte du gène en cause dans la dysplasie cléido-crânienne, permettant une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de l'ostéogenèse.

Embryologiquement, il existe deux types d'ossification : l'ossification enchondrale pour l'ensemble du squelette, provenant des somites où l'ossification implique les chondrocytes, et l'ossification membranaire, qui forme les os plats, provenant des arcs branchiaux, où les ostéoblastes dérivent directement de cellules d'origine mésenchymateuse. On sait que les facteurs de croissance fibroblastiques interviennent dans les deux types d'ossification. Leurs mutations sont responsables d'anomalies osseuses et de craniosténoses dont *médecine/sciences* s'est fait l'écho à diverses reprises (*m/s* n° 11, vol. 10, p. 1163 et [5]).

Le rôle des BMP (pour *bone morphogenetic protein*) a aussi fait l'objet d'un article très complet l'an dernier [6]. Mais on savait que ces protéines, très mal nommées puisqu'elles agissent sur bien d'autres types de cellules dans l'organogenèse de l'embryon et ne sont donc pas spécifiques de la morphogenèse osseuse, ne pouvaient expliquer, à elles seules, l'ostéogenèse. Jusqu'à présent, elles n'ont pas été impliquées dans des maladies humaines, sauf la BMP-4 dont la concentration élevée dans la fibrodysplasie ossifiante progressive induit la formation de tissu osseux ectopique (*m/s* n° 12, vol. 12, p. 1420). En revanche, le gène muté dans la dysplasie cléido-crânienne qui vient d'être découvert joue un rôle clé dans l'ostéogenèse puisqu'il agit directement sur la différenciation et la régulation des ostéoblastes.

Pour commencer, l'équipe de Gérard Karsenty (Texas, USA), qui avait identifié le gène codant pour

l'ostéocalcine (OG2) entreprit de rechercher le(s) facteur(s) de transcription spécifique(s) des ostéoblastes [7]. Dans le promoteur de OG2, elle isola un élément spécifique, agissant en *cis*, qui se lie à un facteur de transcription de la famille CBF (pour *core binding factor*). En fait, le groupe fut étonné de constater que le gène ainsi cloné, *CBFA1*, n'était pas un inconnu. Identifié depuis 1993, il appartient à un groupe de trois gènes *AML1* ou *CBFA2*, *CBFA1* et *CBFA3*, tous trois très conservés dans l'évolution et impliqués dans des translocations associées à des leucémies (le gène *AML1* (*acute myeloid leukemia*), indispensable à l'hématopoïèse (*m/s* n° 5, vol. 12, p. 669) est connu pour former un gène de fusion à l'origine d'une leucémie). Les facteurs de transcription CBF sont des protéines hétérodimériques constituées de sous-unités α liant l'ADN et d'une sous-unité β commune et codée par le gène *CBFB*. L'ensemble des gènes CBF appartient à la famille des gènes à domaine *Runt*, domaine que l'on retrouve dans un gène de la drosophile (*pair-rule*), jouant un rôle dans la segmentation, la détermination sexuelle et le développement du système nerveux. Les protéines *Runt* et CBF reconnaissent une séquence consensus, PuACCPuCA, présente dans de nombreux gènes spécifiques des lymphocytes T (*TCR α* , β , δ , γ), ou codant pour des enzymes de cellules hématopoïétiques, des cytokines et leurs récepteurs. Tout laissait donc supposer que *CBFA1* était impliqué dans la régulation transcriptionnelle des lymphocytes T.

En examinant les souris porteuses d'un gène *Cbfa1* (ou *Pebp2 α A* pour *polyoma enhancer binding protein*) invalidé par recombinaison homologue en vue d'étudier son rôle dans le thymus, une équipe japonaise [8]

s'aperçut rapidement que les souris homozygotes *Cbfa1*^{-/-} mourraient rapidement après la naissance par incapacité respiratoire due à une absence de calcification des côtes, que leur squelette n'était absolument pas calcifié, et que si quelques ostéoclastes immatures étaient présents dans les régions péri-chondrales, le cartilage était dépourvu de cellules mésenchymateuses et de vascularisation. En fait, *Cbfa1* est exprimé en quantité infiniment plus élevée dans l'os que dans le thymus, siège de développement des lymphocytes T.

Au cours du développement du squelette, *Cbfa1* s'exprime très tôt (à 12 jours et demi dans la matrice cartilagineuse), puis dans tous les os examinés, quelle que soit leur origine embryonnaire et le type d'ossification (membraneuse ou enchondrale). Cette expression est strictement limitée aux cellules de la lignée ostéoblastique et réglée par BMP7 et la vitamine D3. La protéine se lie à de multiples gènes exprimés dans les ostéoblastes (codant pour l'ostéocalcine, la chaîne α-1 du collagène de type I, l'ostéopontine, entre autres). Enfin, l'expression forcée de *Cbfa1* dans des cellules autres que des ostéoblastes induit l'expression des gènes spécifiques des ostéoblastes, ce qui tend à prouver que ce gène est nécessaire à la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes *in vivo*.

L'équipe anglo-américaine de Mike Owen obtint les mêmes résultats chez les souris homozygotes pour l'inactivation du gène *Cbfa1* [9]. Les souris hétérozygotes *Cbfa1*^{+/-} présentent un amaigrissement des os du crâne, un retard de fermeture des fontanelles et une désorganisation du cartilage à l'étude histologique. Mais, surtout, elles ont un retard de développement des os plats et une hypoplasie de la clavicule présente seulement à l'état d'ébauche à la naissance. Quant aux souris adultes *Cbfa1*^{+/-}, elles possèdent un phénotype analogue à celui des souris de la lignée Ccd connues depuis une dizaine d'années et mentionnées plus haut. Dès lors, on ne fut pas surpris de voir que, chez ces souris Ccd, la région du gène *Cbfa1* était délétée, avec perte du gène et des marqueurs avoisinants.

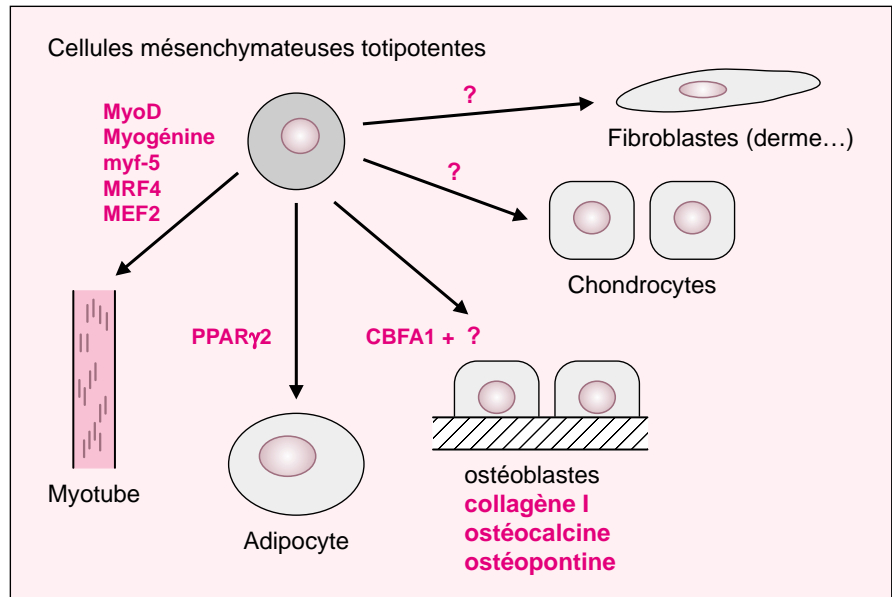


Figure 1. Schéma des voies de différenciation des cellules mésenchymateuses (déjà connues et qui restent à découvrir). (D'après [13].)

Restait à confirmer la perte de fonction du gène *CBFA1* chez des malades atteints de dysplasie cléido-crânienne. Les diverses mutations (délétions, insertions, mutations faux-sens) observées chez des malades non apparentés prouvent à l'évidence que la perte de fonction à l'état hétérozygote est suffisante pour entraîner la maladie [10]. La découverte de ce facteur de transcription essentiel pour la différenciation des ostéoblastes et activant leurs gènes spécifiques suscite de nombreuses réflexions. Les souris hétérozygotes *Cbfa1*^{+/-}, les souris Ccd et les malades atteints de dysplasie cléido-crânienne ont un phénotype analogue avec les mêmes anomalies osseuses montrant que *CBFA1* joue un rôle dans les deux types d'ossification, non seulement dans la différenciation des ostéoblastes mais probablement dans le modelage du squelette, non seulement durant l'embryogenèse mais aussi après la naissance (puisque il existe une petite taille et des os wormiens*). La clavicule, seul os à associer ossification enchondrale et ossification membranaire, est, peut-être de ce fait même, particulièrement sensible à la perte de fonction de *CBFA1* à l'état hétéro-

zygote. La seule différence notable entre le phénotype murin et le phénotype humain est l'absence de dents surnuméraires chez la souris, sans doute parce que cet animal est monophyodonte, alors que chez l'homme existent d'abord des dents dites de lait (dont le nombre aussi est normal en cas de dysplasie cléido-crânienne) ; cette explication n'est évidemment pas suffisante pour comprendre cette perte de contrôle de la régulation de la deuxième dentition. S'il est clair, désormais, que *CBFA1* intervient dans la différenciation des ostéoblastes et que le blocage de ceux-ci entraîne une absence complète d'ostéogenèse, on est encore loin de connaître tous les gènes impliqués dans les deux types d'ossification. *CBFA1* intervient-il dans les interactions périoste-chondrocytes se produisant au cours de la formation des points d'ossification et des cartilages de conjugaison ? Participe-t-il à la formation de cals en cas de fracture ? Il a été démontré que l'expression du gène de l'ostéocalcine est contrôlée par deux régions régulatrices ; un gène encore inconnu reste donc à trouver. Il en va de même pour les gènes des chaînes α1 du collagène de type 1 [11]. Du reste, si l'on s'en réfère au nombre de gènes intervenant dans la myogénèse (*m/s*

* Os surnuméraires de la boîte crânienne dus à un trouble de l'ossification.

n° 5, vol. 12, p. 639; n° 3, vol. 13, p. 401; n° 8/9, vol. 13, p. 1080 et [12]), il y a fort à parier que nous sommes encore loin du compte. Nous nous contenterons donc, pour conclure, de souligner simplement le fait que les différents lignages dérivant des cellules mésenchymateuses obéissent à des facteurs de transcription appartenant à des familles différentes : famille hélice-boucle-hélice pour la différenciation en myotubes, récepteur nucléaire PPAR γ 2 (pour *peroxisome-proliferator-activated receptor*) pour les adipocytes et, à présent, famille CBF à domaine Runt pour les ostéoblastes (figure 1).

L'entrée en scène des différents acteurs de l'ostéogenèse ne fait que commencer.

S.G.

1. Jackson WPU. Osteo-dental dysplasia (cleidocranial dysostosis). The « Arnold head ». *Acta Med Scand* 1951; 139: 292-307.
2. Ramesar RS, Greenberg J, Martin R, Goliath R, Bardien S, Mundlos S, Beighton P. Mapping of the gene for cleidocranial dysplasia in the historical Cape Town (Arnold) kindred and evidence for locus homogeneity. *J Med Genet* 1996; 33: 511-4.
3. Dickman S. No bones about a genetic switch for bone growth. *Science* 1997; 276: 1502.
4. Silience DO, Ritchie HE, Selby PB. Skeletal anomalies in mice with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 1987; 27: 75-85.
5. Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Benoist C, Rousseau F, Le Merrer M, Munnich A. Récepteurs des facteurs de croissance fibroblastiques (FGFR) et anomalies héréditaires de l'ossification enchondrale et membranaire. *Med Sci* 1996; 12 (suppl n° 10): 44-9.
6. Sautier JM, Forest N. Les protéines de la morphogenèse osseuse. *Med Sci* 1996; 12: 364-9.
7. Ducey P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karstynt G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-754.
8. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764.
9. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765-771.
10. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997; 89: 773-779.
11. Rossert JA, Chen SS, Eberspaecher H, Smith CN, de Crombrugge B. Identification of a minimal sequence of the mouse pro- α 1(I) collagen promoter that confers high-level osteoblast expression in transgenic mice and that binds a protein selectively present in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1027-31.
12. Concordet JP. Des knock out à la pelle. *Med Sci* 1992; 8: 1091-6.
13. Rodan GA, Harada S. The missing bone. *Cell* 1997; 89: 677-80.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Toujours plus : voici les vaches callipyges.** Dans les comices agricoles, parmi les Blondes d'Aquitaine réputées pour leur viande, et les Jerseyaises, réputées pour leur lait, on voyait parfois des Bleues Belges, tout à fait monstrueuses du fait de leur énorme masse musculaire. Et pour cause: elles ont deux fois plus de fibres musculaires que les autres [1]. On en ignorait la raison mais une mutation avec transmission autosomique récessive était suspectée, comme cela avait été le cas pour le mouton (*m/s* n° 6-7, vol. 10, p. 743). Par croisements expérimentaux, il apparut que la région d'intérêt correspondait au segment q12-22 du chromosome 2 bovin, orthologue du segment 2q31-33 humain (alors que l'orthologue du gène callipyge ovin est situé sur le chromosome 21) [2].

Un groupe européen de chercheurs vétérinaires (Allemagne, Belgique, France) vient de découvrir le gène doublement délété chez ces bêtes qui, on le conçoit, n'avait pas manqué d'éveiller la convoitise des éleveurs [3]. Il s'agit du gène codant pour la myostatine, *MSTN*, un membre de la superfamille des *TGF β* . Il était déjà connu chez les murins (sous le nom initial de *Gdf8*) et sa double invalidation, réalisée en mai dernier par une équipe de l'Université Johns Hopkins, est capable de produire des souris mutantes volumineuses, aux muscles hypertrophiés, mais au demeurant sans problème (*m/s* n° 8-9, vol. 13, p. 1080) [4]. Cette découverte est... de taille, c'est le moins qu'on puisse dire, non seulement pour ses applications en agriculture, mais aussi parce que ce gène

MSTN joue certainement un rôle essentiel dans le développement musculaire et que la connaissance des autres facteurs avec lesquels il interagit sera passionnante en pathologie musculaire humaine. Mais, avis aux amateurs de *body building* et du style *Terminator* pouvant être tentés par l'invalidation de leurs propres gènes *MSTN*, ces vaches callipyges sont vraiment inesthétiques !

[1. Hanset R. In: Owen JB, Axford RFE, eds. *Breeding for disease resistance in farm animals*. Oxford: CAB International, 1991.]

[2. Charlier C, et al. *Mamm Genome* 1995; 6: 788-92.]

[3. Grobet L, et al. *Nat Genet* 1997; 17: 71-4.]

[4. McPherron A, et al. *Nature* 1997; 387: 83-90.]

3^{es} JOURNÉES D'ACTUALITÉS EN PATHOLOGIE OSSEUSE L'HYPER-RÉSORPTION OSSEUSE ET SES TRAITEMENTS

3-4 avril 1998 – ANGERS – Centre de Congrès

Organisation :

Service de Rhumatologie, CHU d'Angers, LHEA Laboratoire d'Histologie – Embryologie, CHU et Faculté de Médecine d'Angers

Sous les auspices de :

GRIO (Groupe de Recherche et information sur l'ostéoporose), IFFSD (*International Federation for Skeletal Diseases*), Société Française de Rhumatologie, IFM (Institut Français du Myélome), SRO (Société de Rhumatologie de l'Ouest)

Secrétariat :

Mme D. Dumont, LHEA Laboratoire d'Histologie-Embryologie. Faculté de Médecine - 49045 Angers Cedex, France.
Tél. : 02 41 73 58 64 - Fax : 02 41 73 58 88