

***L* le ligand de RET est également impliqué dans la maladie de Hirschsprung**

Les progrès constants de la génétique moléculaire permettent désormais d'envisager une approche mécanistique des maladies ou malformations réputées multigéniques. Suivant ce modèle, le phénotype dépend de l'action conjuguée de plusieurs locus, un gène dominant pouvant voir sa pénétrance modulée par un ou plusieurs gènes modificateur(s), ou un phénotype pouvant apparaître avec un seuil déterminé par l'effet additif de plusieurs allèles indépendants. La maladie de Hirschsprung pourrait être un modèle exemplaire dans ce domaine. Après la découverte de mutations du proto-oncogène *RET* dans la maladie de Hirschsprung en 1994 [1], puis du rôle surprenant de deux gènes participant à la voie de transmission du signal des endothélines, le récepteur EDNRB en 1995 (*m/s* n°8, vol. 11, p. 1172) [2], et son ligand l'endothéline 3 (EDN3) en 1996 [3], cette fin d'année est marquée par l'identification du ligand de Ret, le facteur neurotrophique GDNF [4, 5], et d'une molécule attachée à la membrane indispensable à l'action de ce ligand, GDNFR- α [6, 7]. Ces découvertes constituent des événements de première importance pour la compréhension des mécanismes moléculaires de la maladie de Hirschsprung. La maladie de Hirschsprung est une des plus fréquentes malformations du tube digestif (1 cas sur 5000 naissances). Elle est caractérisée par l'absence des cellules ganglionnaires du système nerveux entérique dans la partie terminale de l'intestin. Il en résulte des graves troubles de la motricité intestinale se révélant en général dès la période néonatale par une occlusion, parfois plus tardivement

par une constipation opiniâtre [8]. Le système nerveux entérique a pour origine les crêtes neurales, à partir desquelles les neuroblastes primitifs migrent le long du tractus digestif, dans le sens oral-aboral. Ainsi, l'aganglionose de la maladie de Hirschsprung résulte d'une anomalie de migration, de différenciation ou de survie de ces cellules au cours du développement embryonnaire. Alors que les cas de maladie de Hirschsprung sont sporadiques en grande majorité (80 %), l'existence de formes familiales atteste de facteurs génétiques. Les analyses de ségrégations concluent à un mode de transmission multifactorielle incluant un (ou plusieurs) gène(s) dominant(s) de faible pénétrance [9]. La présence chez certains patients d'anomalies cytogénétiques sur des chromosomes variés, la faible pénétrance des mutations de *RET*, et la prédominance de garçons atteints (rapport garçons/filles = 3,5) sont autant d'arguments en faveur de l'hétérogénéité génétique de la maladie de Hirschsprung (les mutations de plusieurs gènes pouvant conduire à la maladie de façon indépendante), et appuient aussi l'hypothèse d'un mode héréditaire multigénique ; des anomalies combinées de plusieurs gènes peuvent être en cause chez un même patient.

Des mutations dans le gène codant pour le ligand de RET : confirmation de l'hétérogénéité génétique de la maladie de Hirschsprung

Le GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), est un membre éloigné de la superfamille du TGF- β , doué d'un rôle trophique pour les neurones dopaminergiques et les moto-

neurones [10, 11]. Plusieurs travaux récents ont conduit à émettre l'hypothèse que GDNF devait également intervenir dans la mise en place du système nerveux entérique. L'étude de l'expression de *GDNF* chez l'embryon montrant un taux d'ARN messager très élevé dans le tube digestif et le rein [12] en constituait déjà le premier argument. La deuxième observation est venue de l'invalidation ciblée du gène *Gdnf* chez la souris *Gdnf*^{-/-} aboutissant à l'état homozygote à un phénotype très proche de celui des souris *Ret*^{-/-} : aganglionose digestive et agénésie rénale [13-15]. La similitude des souris *Gdnf*^{-/-} et *Ret*^{-/-} suggérait aussi un lien étroit entre ces deux protéines. Ne connaissant ni le récepteur de GDNF, ni le ligand de RET, il était donc tentant de penser que GDNF était le (ou l'un des) ligand(s) de ce récepteur tyrosine-kinase orphelin depuis 1988. La réponse a été donnée par deux types d'approches différentes ayant fait l'objet de quatre publications concomitantes dans les numéros de *Nature* et de *Cell* datés des 4 juillet et 28 juin 1996 [4-7]. La recherche du récepteur de GDNF dans une banque d'expression a permis d'identifier un complexe ternaire composé du ligand (GDNF), du récepteur tyrosine-kinase transmembranaire (RET) et d'une molécule fixée à la surface externe de la membrane (GDNFR- α), corécepteur indispensable à l'activation de RET par GDNF [6, 7] (*figure 1*). D'autres études portant sur différents modèles cellulaires *in vitro* montrent clairement l'activation spécifique de RET par GDNF [4, 5] (voir pour plus de détail la mise au point sur ce sujet dans ce même numéro p 1408).

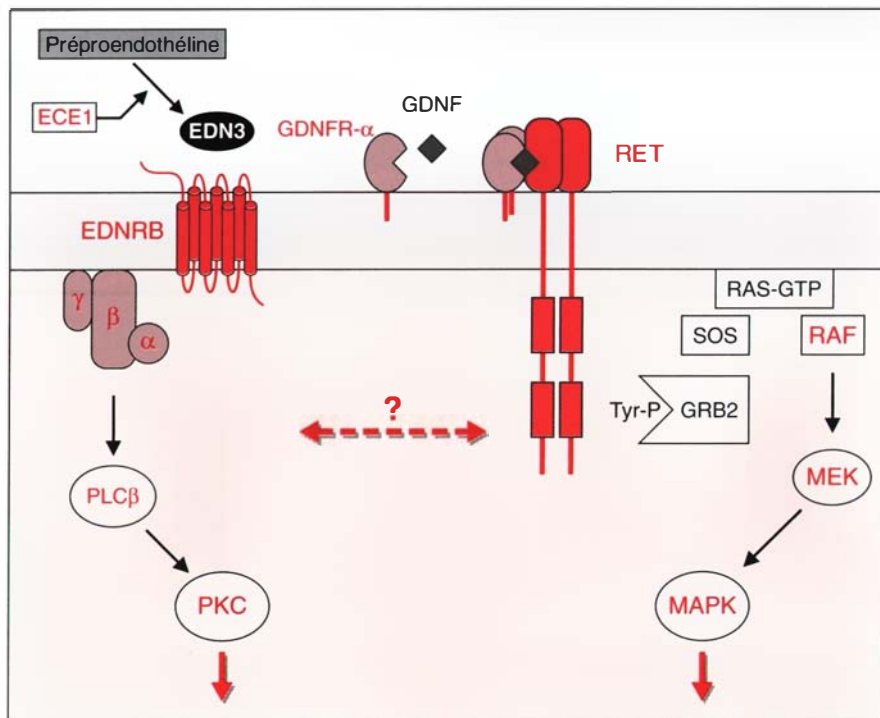


Figure 1. **Gènes impliqués dans la maladie de Hirschsprung.** Deux voies de transmission du signal sont concernées dans la maladie de Hirschsprung : la voie des endothélines avec des mutations d'un ligand (endothéline 3, EDN3), de son récepteur membranaire couplé aux protéines G (EDNRB) et, vraisemblablement, d'une enzyme indispensable à la maturation de ce ligand (enzyme de conversion de l'endothéline, ECE-1). L'autre voie impliquée passe par le proto-oncogène RET, récepteur de type tyrosine-kinase, et son ligand GDNF. Le corécepteur GDNFR- α , indispensable à l'activation de RET, ainsi que les autres protéines participant à la transmission du signal représentent donc de bons gènes candidats pour la maladie de Hirschsprung. PLC β : phospholipase C β , PKC : phosphokinase C ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; MEK : MAPK/ERK kinase.

Compte tenu du phénotype observé chez la souris *Gdnf*^{-/-} et de la confirmation dans différents modèles de l'activation spécifique de RET par GDNF, il semblait très probable que ce facteur neurotrophique puisse également intervenir dans la mise en place du système nerveux entérique, et constituait donc un très bon gène candidat pour la maladie de Hirschsprung.

La recherche de mutations dans la séquence codante de *GDNF* dans une grande série de patients atteints de maladie de Hirschsprung (175 sujets atteints) s'est effectivement révélée fructueuse, avec l'identification de trois mutations faux-sens (P21S, R93W, D150N) situées dans des régions conservées chez le rat, à proximité d'un site de clivage du pro-

GDNF pour l'une d'entre elles (P21S) ou à proximité d'un résidu cystéine (D150N). Ces mutations ont été retrouvées à l'état hétérozygote chez des patients atteints de maladie de Hirschsprung dans deux familles multiplex et dans un cas sporadique [16].

Les mutations de GDNF dans la maladie de Hirschsprung sont associées à d'autres anomalies génétiques

De façon surprenante les mutations de GDNF identifiées par notre équipe ont été observées à chaque fois dans un contexte génétique particulier. Il s'agit, dans le cas sporadique, de l'association à une trisomie 21 et, dans les deux cas familiaux, de l'association à des anomalies démon-

trées ou vraisemblables du gène codant pour RET [16]. Ainsi, la mutation P21S a été retrouvée dans une famille multiplex chez deux individus atteints qui, seuls dans une fratrie de six, partageaient les mêmes haplotypes au locus *RET*, indiquant qu'une mutation ou un variant non détectée de ce gène pourrait contribuer au phénotype chez ces deux enfants. Plus convaincante encore est l'association à la mutation R93W de *GDNF* (figure 2) d'une mutation silencieuse de l'exon 11 de *RET* (S649S) qui a pour effet de démasquer un site cryptique accepteur d'épissage. Il en résulte un variant de RET plus court de 20 acides aminés dans le domaine transmembranaire. L'existence dans une même famille et chez un même patient de mutations dans deux gènes différents suggère que la maladie de Hirschsprung pourrait résulter de l'effet combiné (ou additif) d'anomalies du ligand (GDNF) et de son récepteur (RET).

La situation est probablement encore plus complexe. En effet alors que le variant S649S de *RET* est présent chez tous les membres d'une grande famille, la mutation R93W de *GDNF* n'a pas été retrouvée chez tous les individus atteints ; en revanche, elle existe chez plusieurs individus sains. D'autres locus doivent donc intervenir pour influencer l'expression de *RET* et de *GDNF*. De fait, l'hypothèse du multigénisme pour la maladie de Hirschsprung a déjà été évoquée par A. Chakravarti à propos d'une grande famille d'origine mennonite dans laquelle une mutation faux-sens du gène *EDNRB* (W276C) associée de façon non aléatoire à un polymorphisme du gène *RET*, suggérerait l'interaction des voies de transmission du signal *via* les protéines G (EDNRB), d'une part, et *via* les récepteurs tyrosine-kinase (RET), d'autre part (figure 1) [17]. Cela évoque aussi l'éventualité dans la maladie de Hirschsprung d'autres gènes candidats codant pour des protéines participant également à ces deux voies de transmission des signaux cellulaires à partir de récepteurs membranaires.

La découverte d'anomalies de locus indépendants chez un même individu fait donc de la maladie de Hirsch-

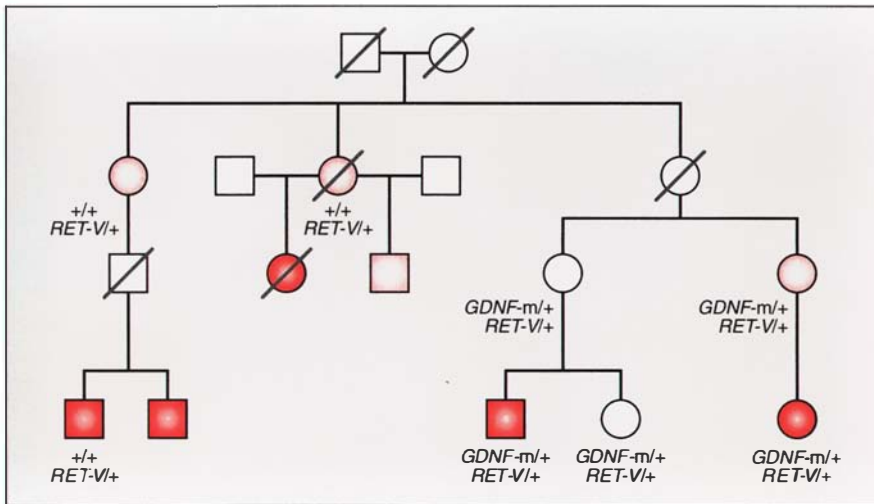


Figure 2. Pedigree d'une famille au sein de laquelle coségrégent une mutation de GDNF et un variant de RET. GDNF-m/+ : mutation faux-sens (R93W) hétérozygote de GDNF. RET-V/+ : variant de RET (S649S) démasquant un site cryptique d'épissage, ayant pour effet l'apparition d'une isoforme délétée de 20 acides aminés au niveau du domaine transmembranaire. Alors que le variant S649S de RET est présent chez tous les membres de cette famille, la mutation R93W de GDNF n'a pas été retrouvée chez tous les individus atteints; en revanche, elle existe chez plusieurs individus sains. D'autres locus doivent donc intervenir pour influencer l'expression de RET et de GDNF.

prung un des tout premiers modèles de maladie humaine dans laquelle l'hypothèse du multigénisme pourrait être validée au niveau moléculaire. L'étude *in vitro* des effets combinés des mutations de ces différents gènes est désormais une étape indispensable pour confirmer cette analyse ■

RÉFÉRENCES

1. Edery P, Pelet A, Mulligan LM, Abel L, Attié T, *et al.* Long segment and short segment familial Hirschsprung's disease: variable clinical expression at the RET locus. *J Med Genet* 1994; 31: 602-6.
2. Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, de Wit D, Yanagisawa M, Chakravarti A. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 1994; 79: 1257-66.
3. Edery P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich

A, Lyonnet S. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nature Genet* 1996; 12: 442-4.

4. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, *et al.* GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996; 381: 789-93.

5. Trupp M, Arenas E, Fainsilber M, Nilsson AS, Sieber BE, *et al.* Functional receptor for GDNF encoded by the *c-ret* proto-oncogene. *Nature* 1996; 381: 785-9.

6. Treanor J, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, *et al.* Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382: 80-3.

7. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PJ, Luo Y, *et al.* GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85: 1113-24.

8. Rescorla F, Morrison A, Engles D, West K, Grosfeld J. Hirschsprung's disease. Evaluation of mortality and long-term function in 260 cases. *Arch Surg* 1992; 127: 934-42.

9. Bolande, R. The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol* 1993; 5: 409-29.

10. Lin L, Doherty D, Lile J, Bektesh S, Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-2.

11. Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevet DM, Wang S. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 1995; 373: 344-6.

12. Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 1995; 130: 137-48.

13. Sanchez M, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 70-3.

14. Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, *et al.* Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 73-6.

15. Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carven-Moore K, Rosenthal A. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 76-9.

16. Salomon R, Attié T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, Sarnacki S, Goulet O, Ricour C, Nihoul-Fékété C, Munnich A, Lyonnet S. Germline mutations of the RET ligand, GDNF, are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nature Genet* 1996; 14: 345-7.

17. Chakravarti A. Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung disease. *Hum Molecul Genet* 1996; 5: 303-7.

Rémi Salomon
Tania Attié
Chrystelle Bidaud
Stanislas Lyonnet
Arnold Munnich

Inserm U.12, hôpital Necker, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

TIRÉS À PART

S. Lyonnet.