

Un mécanisme inédit d'épissage aberrant d'un ARN messenger à l'origine de formes sporadiques de sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA, maladie de Charcot parfois aussi appelée maladie de Lou Gerhig par les Anglo-Saxons) est une maladie rare mais dramatique, touchant exclusivement les motoneurones de la moelle épinière, du bulbe et du cortex moteur. Elle débute en général au cours de la 4^e ou de la 5^e décennie pour conduire à la mort en deux à trois ans à la suite d'une atrophie musculaire généralisée résultant de la dégénérescence des motoneurones. Aucun traitement efficace n'est actuellement disponible.

Dans 5% des cas, la SLA est héréditaire, à transmission autosomique dominante. Dans une petite partie de ces cas, environ un sur cinq, une mutation ponctuelle (en fait plus de 45 mutations différentes ont été décrites actuellement) a été retrouvée dans le gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc (SOD1), et a orienté les recherches vers un mécanisme dégénératif impliquant une surproduction de radicaux libres. Cette explication semble toutefois insuffisante car nombre des mutations décrites n'affectent pas l'activité de la SOD1. De façon surprenante, les souris mutantes ne synthétisant pas du tout de SOD1 sont normales, contrairement à certaines souris transgéniques exprimant des formes mutées de SOD1: sans modification de l'activité dismutase, elles développent une dégénérescence des motoneurones [1].

Dans 95% des cas, la SLA est sporadique. En 1995, le groupe de Jeffrey Rothstein (Université Johns Hopkins, Baltimore, MD, USA) avait déjà montré que dans les 2/3 de ces cas, la fonction d'un transporteur astrocytaire du glutamate, GLT-1 ou EAAT2, était abolie. Rappelons que sont

actuellement connus quatre types de transporteurs des acides aminés excitateurs, à forte affinité et dépendants du Na et du K: glutamate/aspartate transporteur 1 (GLAST ou EAAT1), glutamate transporteur 1 (GLT-1 ou EAAT2), *excitatory amino acid carrier 1* (EAAC1 ou EAAT3), et *excitatory amino acid transporter 4* (EAAT4). Les transporteurs EAAT1 et EAAT2 sont exprimés par les astrocytes, EAAC1 par les astrocytes immatures et les neurones. Les résultats de l'équipe de Rothstein venaient à l'appui de l'hypothèse excito-toxique: un défaut de recapture du glutamate provoquerait une stimulation excessive des récepteurs de type AMPA/kainate et NMDA dont résulterait une production accrue de radicaux libres superoxyde et peroxyde nitrique.

Dans un élégant travail utilisant des oligonucléotides antisens, perfusés en intramédullaire et inhibant l'expression des transporteurs astrocytaires du glutamate, soit GLT-1, soit GLAST, le même groupe parvenait à induire une dégénérescence des motoneurones, tandis que l'inhibition du transporteur neuronal, EAAC1, s'avérait sans effet [3]. Restait à identifier le mécanisme présidant à l'absence de EAAT2 dans les formes sporadiques de SLA. Dans l'article le plus récent [4], Rothstein et ses collaborateurs mettent en évidence un phénomène d'épissage aberrant du messenger de EAAT2 conduisant à la production d'un transporteur non fonctionnel. En outre, cette anomalie d'épissage ne résulte pas d'une mutation du gène de EAAT2, mais apparaît liée à un défaut de la machinerie d'épissage, le *spliceosome* [5].

La plupart des gènes eucaryotes sont interrompus par des introns, qui

s'avèrent être souvent des séquences très étendues dont les fonctions restent mal comprises. Lors de la transcription, l'ARN-polymérase produit un ARN messenger précurseur qui est une réplique exacte du gène. Ce pré-messenger est pris en charge par les *spliceosomes*, agrégats de 70 protéines et 5 ARN nucléaires de petite taille, qui vont exciser les introns pour produire un ARN messenger mûr, prêt à être exporté vers le cytoplasme et l'appareil de traduction.

Le *spliceosome* travaille en même temps et de concert avec l'ARN-polymérase. Certains éléments de cette machinerie vont reconnaître l'extrémité 5' d'un intron, indiquée par un site donneur formé d'un dinucléotide GU, tandis que l'extrémité 3' sera reconnue par son site accepteur AG. On a récemment décrit des introns présentant un site donneur AU et accepteur AC, et utilisant des petits ARN d'épissage spécifiques [6]. Un épissage alternatif peut être produit par inclusion ou exclusion d'exons particuliers. Il semble que les séquences flanquant les sites donneur et accepteur, aussi bien du côté de l'intron (ISE pour *intronic splicing enhancer*) que de l'exon (ESE pour *exonic splicing enhancer*), déterminent l'activité du site d'épissage en liant des facteurs transactivateurs.

En théorie, chacune des étapes décrites ci-dessus peut être altérée et conduire à un processus pathologique. Au cours des dernières années, plusieurs exemples sont venus confirmer cette hypothèse. On imagine en effet aisément qu'une simple mutation (mutation ponctuelle, délétion ou insertion) au sein du site accepteur ou donneur va provoquer l'exclusion d'un exon, qui peut être essentiel pour

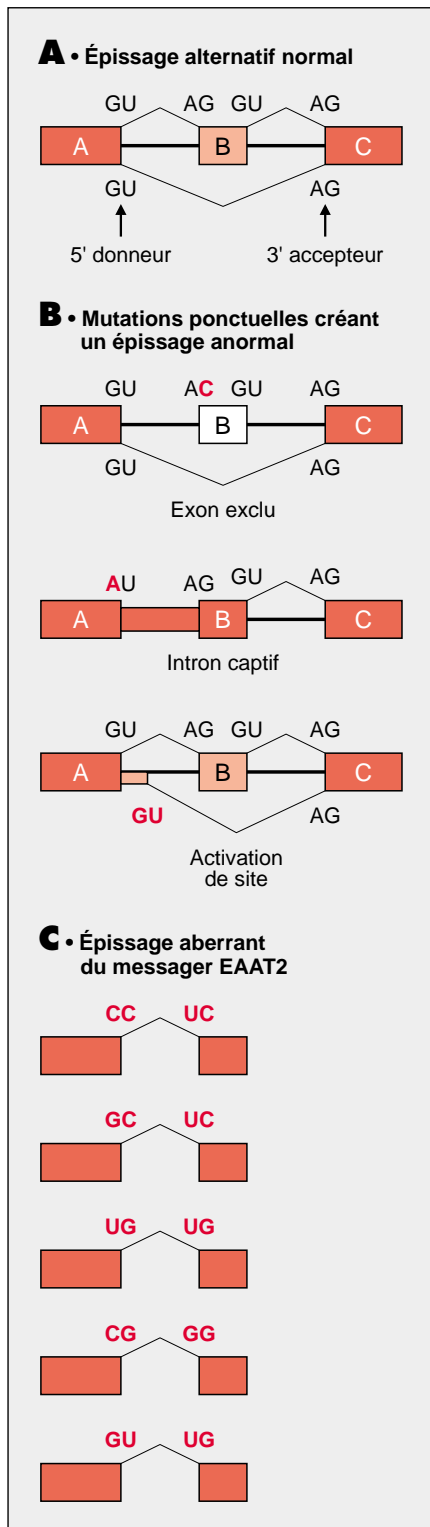


Figure 1. **Représentation schématique des mécanismes d'épissage normal et pathologiques.** A. Cas général où l'épissage respecte la règle «GT-AG» (GU-AG sur l'ARN pré-messager). B. Différentes possibilités résultant d'une mutation ponctuelle, soit du site donneur, soit du site accepteur, soit de l'apparition par mutation d'un nouveau site donneur ou accepteur au sein de l'un des introns ou des exons. C. Exemple de séquences trouvées par Rothstein et al. dans les ARN messagers EAAT2 de 20 patients atteints de la forme sporadique de SLA.

phase de lecture. Il en sera de même au niveau des sites *cis*-activateurs introniques ou exoniques. Dès 1983, un tel phénomène a été reconnu être à l'origine de la β -thalassémie. Dans cette maladie, un site cryptique dans le gène de la β -globine conduit à la délétion partielle d'un exon et/ou à la conservation partielle d'un intron. Le syndrome de résistance à la vitamine D est lié, dans certaines formes héréditaires, à l'exclusion de l'exon 4 dont résulte un récepteur non fonctionnel. On a rapporté une mutation d'un ESE dans une forme de dystrophie musculaire de Becker. Toutes ces mutations concernent le génome et produisent un ARN messenger anormal unique. Plus de 200 mutations de ce type, concernant près de 90 gènes et de nombreuses maladies humaines, ont été rapportées et sont collectées sur le site web : <http://www.imcb.osaka-u.ac.jp/nakai/asdb.html>.

Plus récemment, un élément du *spliceosome* a été identifié comme étant directement lié à l'origine des amyotrophies spinales [7]. En effet le gène défectueux responsable de ces maladies, *SMN* pour *survival motor neuron protein*, code pour une protéine nécessaire à l'assemblage des ARN de petite taille du *spliceosome*. Le produit de ce gène est absent dans les amyotrophies spinales.

La découverte du groupe de Rothstein est encore plus surprenante, car elle met en évidence un épissage anormal du pré-messager de EAAT2 sans mutation génomique associée,

du moins sur le gène de EAAT2, et sans atteinte de l'épissage d'autres pré-messagers. Pourtant les auteurs ont observé chez 20 patients parmi 30 atteints d'une forme sporadique de SLA, des reconnaissances aberrantes de sites 5' et/ou 3' du pré-messager de EAAT2, produisant une variété d'ARN messagers anormaux, qui représentent jusqu'à 70% du total des ARNm EAAT2. Deux variétés dominent : l'une contient partiellement l'intron 7 et l'autre ne présente pas l'exon 9. Ces messagers aberrants ne permettent pas l'expression d'une protéine fonctionnelle, comme l'indiquent des expériences de transfection dans des cellules Cos. La protéine correspondant à la plupart de ces messagers n'est pas détectable en immunoréplique, soit par dégradation rapide, soit en raison d'une conformation spatiale aberrante elle aussi. Les protéines anormales ne trouvent pas le chemin normal, pour un transporteur de neurotransmetteur, vers la membrane. Au contraire, certaines formes s'accumulent autour du noyau. Enfin, lorsque la protéine aberrante est co-exprimée avec la protéine normale, elle inhibe l'expression et la localisation membranaire de cette dernière. Ces derniers résultats pourraient rendre compte de la diminution de 30% à 95% des quantités de protéine EAAT2 précédemment rapportées chez des patients atteints de SLA.

Comment le message anormal exerce-t-il un effet dominant négatif sur l'expression de la protéine naturelle? L'hypothèse retenue fait intervenir une oligomérisation du transporteur pour obtenir sa forme fonctionnelle; l'assemblage d'une protéine normale avec une protéine mutante déstabiliserait le tout.

Le coupable serait donc un facteur régulateur de l'épissage, spécifique du pré-messager EAAT2 jusqu'à preuve du contraire. Ce facteur serait également spécifique du cortex moteur et de la moelle épinière, puisque les messagers aberrants ne sont pas détectés dans le cervelet, par exemple, dans lequel les astrocytes expriment pourtant le transporteur EAAT2. Ce résultat pourrait suggérer que l'anomalie observée de l'épissage d'EAAT2 est, en fait, secondaire à la dégénérescence

l'activité ou la localisation d'une protéine. Une autre mutation peut créer au contraire un site *de novo*, transformant tout ou partie d'un intron en exon ou provoquant un décalage de la

des motoneurones, voire même réactive à cette anomalie. La dizaine de patients présentant une SLA caractérisée, et ne présentant pas d'anomalies d'EAAT2 va, toutefois, à l'encontre de cette hypothèse. De même, les auteurs ne détectent aucune anomalie de l'épissage d'EAAT2 dans d'autres maladies neurodégénératives comme les amyotrophies spinales infantiles, la maladie de Huntington et la maladie d'Alzheimer, où sont présentes des dégénérescences neuronales, y compris des motoneurones, accompagnées d'une réaction de gliose astrocytaire. Inversement, les souris mutantes n'exprimant pas EAAT2 développent une dégénérescence des motoneurones [8] et les souris exprimant des formes anormales de SOD1, correspondant aux formes identifiées dans les formes familiales humaines de SLA, développent une dégénérescence motoneuronale secondaire à une maladie des astrocytes associée à une diminution de l'expression de EAAT2 [1].

Ce travail ouvre un champ d'investigation nouveau et sera appliqué, à n'en pas douter, à d'autres affections sporadiques dégénératives à révélation tardive (on pense immédiatement à la maladie de Parkinson dans laquelle des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été rapportées sans qu'une base génétique fiable puisse y être associée). Il soulève également de nombreuses questions. La première est, bien sûr : pourquoi les motoneurones et pourquoi si tard ? Une hypothèse courante met en avant le métabolisme très actif de ces neurones et leur faible protection contre le *stress oxydatif*. Rappe-

* **GLOSSAIRE** *

SLA : sclérose latérale amyotrophique.
SOD : superoxyde dismutase.
GLAST ou EAAT1 : glutamate-aspartate transporter-1 ou excitatory amino acid transporter-1.
GLT-1 ou EAAT2 : glutamate transporter-1 ou excitatory amino acid transporter-2.
EAAC1 ou EAAT3 : excitatory amino acid carrier-1 ou excitatory amino acid transporter-3.
EAAC2 ou EAAT4 : excitatory amino acid transporter-2 ou excitatory amino acid transporter-4.

lons que l'anomalie reconnue siège dans le noyau des astrocytes qui possèdent, quant à eux, une excellente machinerie contre le *stress oxydatif* (catalase et glutathion peroxydase). Une autre question concerne la spécificité de l'atteinte du pré-messager EAAT2. Il est possible, toutefois, que le facteur d'épissage altéré soit également impliqué dans la maturation d'ARN encore inconnus aujourd'hui. Enfin, quel est le mécanisme responsable du tiers des formes de SLA sporadiques dans lesquelles EAAT2 n'est pas modifié ? Dans l'étude de Rothstein, ni EAAT1 ni la protéine SMN ne sont atteints. Restent à examiner EAAT3 et EAAT4, et les nombreux éléments participant à la synthèse, à la libération, ou dans lequel la dégradation du glutamate.

Dans le champ clinique, la possibilité d'identifier les messagers EAAT2 dans le liquide céphalo-rachidien offre une possibilité supplémentaire au diagnostic précoce d'une grande

partie des formes sporadiques de SLA, et servira à orienter des essais cliniques visant à limiter l'excitotoxicité associée au glutamate [9, 10].

M.F.
H.C.

1. Buijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997; 18: 327-38.
2. Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 73-84.
3. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; 16: 675-86.
4. Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 1998; 20: 589-602.
5. Lygerou Z, Kandelis Lewis S, Séraphin B. Le rôle des snRNP dans l'épissage des ARN pré-messagers. *Med Sci* 1993; 9: 165-70.
6. Tarn WY, Steitz JA. Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 132-7.
7. Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 1997; 90: 1013-21.
8. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, *et al.* Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997; 276: 1699-702.
9. Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V, *et al.* Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 1996; 347: 1425-31.
10. Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 147-57.



**IMGT
NEWS**

**Séquences protéiques - Représentations 3D -
Analyse de séquences**

IMGT, the international ImMunoGeneTics DataBase, annonce : • la **présentation des séquences protéiques** des régions variables des immunoglobulines et récepteurs T humains en accord avec la description des mutations et les alignements d'allèles (IMGT NEWS - Août 1997), • **les premières représentations 3D** des régions variables d'anticorps et de récepteurs T, basées sur la numérotation unique IMGT définie par Marie-Paule Lefranc (IMGT NEWS - Mars 1997), • **IMGT/DNAPLOT** pour l'analyse des séquences réarrangées des immunoglobulines et récepteurs T humains et pour l'identification des sous-groupes des séquences IGHV de souris. Toutes ces informations sont accessibles à IMGT : <http://imgt.cnusc.fr:8104>

Flash sur IMGT > 24 000 séquences d'Ig e de TcR de 81 espèces, > 17 000 sites connectés depuis le 1^{er} janvier 96, > 2 500 requêtes par semaine

Initiateur et coordinateur de IMGT : Pr Marie-Paule Lefranc, Laboratoire d'ImmunoGénétique Moléculaire, LIGM, UMR 5535 (CNRS - Université Montpellier II), 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5 - France - Tél. : +33 (0)4 67 61 36 34 - Fax : +33 (0)4 67 04 02 31 - lefranc@ligm.crbm.cnrs-mop.fr

Référence IMGT : Lefranc M.-P., Immunology Today, 18, 509 (1997), Lefranc M.-P. et al., Nucleic Acids Research, 26, 297-303 (1998)