

Multiplicité des lésions moléculaires de la rhodopsine dans la rétinite pigmentaire

Pour la première fois, en 1990, une équipe de Boston décrivait une lésion moléculaire dans la forme autosomique dominante de la rétinite pigmentaire (*m/s* n° 4, vol. 6, p. 402). Le gène intéressé était celui de la rhodopsine, pigment visuel des bâtonnets, gène localisé sur le bras long du chromosome 3. Il compte cinq exons et code pour une protéine de 348 acides aminés, qui porte 7 segments membranaires. Depuis cette date, le nombre de malades analysés et celui des mutations identifiées se sont accrus rapidement, grâce aux efforts de deux équipes : celle, précitée, de Dryja, la première à être entrée en lice, et celle groupée autour de Nathans (Baltimore, MD, USA), qui avait élucidé dès 1984 la séquence de l'ADNc et celle de la protéine.

(1) Les lésions moléculaires. Elles ont été analysées par deux méthodes : amplification des exons suivie de séquençage, et électrophorèse en gradient dénaturant, technique plus rapide car elle permet de ne séquencer que les bandes anormales. Dryja *et al.* [1], étudiant 150 malades non apparentés, ont trouvé des anomalies chez 43 d'entre eux, tous porteurs d'une mutation et jamais de plus d'une. Ils ont observé 21 mutations différentes, dont 17 liées à une rétinite pigmentaire et coségrégant avec elle. Deux exemples de polymorphisme non pathogène et deux de mutations n'altérant pas la nature de l'acide aminé ont également été trouvés. Dans un cas s'est produite une mutation nouvelle, absente chez les parents mais transmise à un descendant. Sung *et al.* [2], sur 161 malades, ont reconnu 39 mutants, porteurs de 13 mutations différentes. Toutes sont ponctuelles, l'une d'elles aboutit à un codon de terminaison. Enfin, une unique observation de délétion a été publiée par un groupe bri-

tannique [3], qui enlève un résidu isoleucine du fait de l'amputation de trois bases.

Si l'on compare ces trois articles, on constate que sur un total de 31 mutations décrites indépendamment, cinq seulement sont communes à [1] et [2] ; trois de ces dernières ont été également trouvées par un autre groupe américain [6]. On en reconnaît donc 26 différentes, dont 12 décrites uniquement par Dryja *et al.* [1], huit par Sung *et al.* [2] et une par Inglehearn *et al.* [3].

Toutes sauf une sont ponctuelles, une seule est non-sens, une seule est apparue *de novo*. Presque toutes n'ont été détectées qu'une seule fois, ou plus rarement deux, avec deux exceptions : la première découverte, mutation 23 Pro → His, représente environ la moitié du total des familles ; cependant, son association avec un allèle rare dans l'intron 1 est en faveur d'un effet fondateur et non d'une récurrence. Au contraire, le deuxième mutant à fréquence relativement grande, 347 Pro → Leu, retrouvé neuf fois, semble être apparu au moins trois fois indépendamment, dont une fois *de novo* dans la série de [1]. Dernier élément que l'on peut tirer de la comparaison des articles : en quatre positions, deux mutations différentes ont été observées, donnant lieu à deux changements différents d'acides aminés.

(2) Les mécanismes. Du travail de Dryja *et al.*, on peut tirer deux enseignements. Les mutations peuvent porter sur les trois régions principales de la protéine : huit touchent la portion initiale, extracellulaire ; six, la portion membranaire ; trois, la portion cytoplasmique. On remarque enfin la très grande fréquence des mutations frappant un dinucléotide CpC ou CpG. Le mécanisme de ces altérations est bien connu : les C sont méthylables... et

méthylés dans la plupart des cas, surtout au niveau des gènes inactifs. La désamination de la méthyl-cytosine la transforme en thymine, provoquant donc (selon les brins), des transitions C → T ou G → A [4].

Dans un travail destiné à mieux comprendre l'effet des altérations de la molécule de la rhodopsine, l'équipe de Nathans [5] a transfecté des cellules de rein humain embryonnaire avec des plasmides d'expression d'ADNc de rhodopsine normale ou de ses 13 mutants, obtenus par mutagenèse dirigée. Ils ont étudié le taux d'expression, le degré de polymérisation évalué par électrophorèse, la possibilité de régénération par un ligand, le 11-*cis*-rétinal, et la localisation subcellulaire. On peut ainsi distinguer deux grandes classes de mutants : trois d'entre eux se montrent normaux pour les quatre tests mis en œuvre, qui ne fournissent donc pas d'explication à leur pathogénéité. Les dix autres font partie de la classe II ; ils montrent des taux abaissés, s'agrègent de façon anormale, se fixent peu ou mal au 11-*cis*-rétinal, et sont mal transportés à la membrane plasmique. Ces mutants de classe II s'intègrent dans une catégorie générale de mutants pathologiques ou expérimentaux, qui sont retenus dans le système réticulo-endothélial lorsque la protéine est incorrectement repliée ou assemblée. Ces travaux constituent donc une étape importante sur la voie de la compréhension des mécanismes qui interviennent dans le dysfonctionnement des protéines de membrane.

J.-C. D.

1. Dryja TP, Hahn LB, Cowley GS, McGee TL, Berson EL. Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9370-4.

-
2. Sung CH, Davenport CM, Hennessey JC, *et al.* Rhodopsin mutations in autosomal dominant *retinitis pigmentosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 6481-5.
 3. Inglehearn CF, Bashir R, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS. A 3bp deletion in the rhodopsin gene in a family with autosomal dominant *retinitis pigmentosa*. *Am J Hum Genet* 1991 ; 48 : 26-30.
 4. Jordan BR. Ilots HTF : le gène annoncé. *Médecine/sciences* 1991 ; 7 : 153-60.
 5. Sung CH, Schneider BG, Agarwal N, Papermaster DS, Nathans J. Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant *retinitis pigmentosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8840-4.
 6. Sheffield VC, Fishman GA, Beck JS, Kimura AE, Stone ES. Identification of novel rhodopsin mutations associated with *retinitis pigmentosa* by GC-clamped denaturing gradient gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1991 ; 49 : 699-706.
-

■■■■ BRÈVE ■■■■

■■■■ **Souris déficientes en interleukine 4 produites par recombinaison homologue.** L'IL-4 semble active sur la croissance et sur la différenciation de nombreuses lignées de cellules hématopoïétiques *ex vivo*. Notamment, IL-4 se comporte en culture comme un facteur de croissance des lymphocytes T. De plus, cette cytokine semble indispensable à la commutation de classe des gènes d'immunoglobulines et à l'apparition des isotypes IgG 1 et IgG E. Des souris transgéniques homozygotes pour une mutagenèse insertionnelle inactivatrice produite par recombinaison homologue ont été obtenues par une équipe de Cologne en Allemagne [1]. Chez ces animaux, le développement global des populations de lymphocytes T est parfaitement normal. La seule anomalie constatée est une diminution extrêmement importante des isotypes d'immunoglobulines IgG 1 et IgG E, et une très faible réponse anticorps de type IgG 1. De plus, l'infestation de ces souris par des parasites (nématodes) n'induit pas l'augmentation habituelle des IgG E. Par conséquent, parmi tous les effets biologiques constatés expérimentalement de l'IL-4, seule, d'après ces expériences préliminaires, l'action sur la commutation de classe des immunoglobulines semble vraiment spécifique et ne pouvoir être contrôlée par d'autres cytokines.

[1. Kükn R, *et al.* *Science* 1991 ; 254 : 707-10.]

■■■ Les récepteurs de la calcitonine, de l'hormone parathyroïdienne et de la sécrétine : une nouvelle classe de récepteurs liés aux protéines G. Les très importantes similitudes existant entre certaines régions des récepteurs couplés aux protéines G [1, 2] avaient fini par convaincre les chercheurs que tous les récepteurs de ce type devaient appartenir à la même famille. Rappelons que ces molécules possèdent sept passages transmembranaires et comportent des motifs particulièrement conservés, notamment la troisième boucle interne qui serait en contact avec les protéines G. Ces analogies ont conduit Gilbert Vassart ([1] et *m/s* n° 6, vol. 7, p. 634) à amplifier au hasard par PCR des séquences de ce type, ce qui lui a permis de découvrir de nouveaux membres de cette famille comportant, à ce jour, environ 120 récepteurs. Tout n'était cependant pas dit et quelques récepteurs, manifestement couplés à des protéines G, résistaient encore, notamment ceux de la calcitonine, de la parathormone, de la sécrétine et du glucagon. Cette résistance a cédé pour les trois premiers récepteurs dont les ADNc viennent d'être clonés, permettant la déduction de leur structure. Ces résultats ont été obtenus par une équipe japonaise d'Osaka et Tokyo pour les récepteurs de la sécrétine [3], par des équipes américaines de Boston et Cambridge, dans le Massachusetts, pour les récepteurs de la calcitonine et de la parathormone [4, 5]. Dans tous les cas, la méthode de clonage a été similaire, fondée sur l'expression dans des cellules de rein de singe COS. Des banques d'ADNc de différentes lignées cellulaires riches en les récepteurs recherchés ont été construites et des *pools* de clones ont été introduits par transfection dans des cellules COS au niveau desquelles on a alors recherché la liaison de l'hormone spécifique radioactive, selon différentes méthodes. Ensuite, le sous-fractionnement des *pools* positifs a permis de parvenir aux ADNc responsables de la synthèse du récepteur à la membrane des cellules COS

transfectées. Les protéines déduites des trois types de séquences d'ADNc ont toutes sept passages transmembranaires, comme les membres de la super-famille connus jusqu'à présent, mais n'ont avec eux que moins de 12 % d'analogies, y compris dans les régions les plus conservées, qui sont à 80 % identiques entre les molécules de cette même grande famille. C'est donc à un nouveau type de récepteurs que l'on a affaire, tous couplés à une protéine Gs et à l'adénylate cyclase pour les trois premiers à avoir été isolés. Le récepteur du glucagon, encore non identifié malgré des recherches intenses, voire celui de l'ACTH, tous deux couplés, eux aussi, à l'AMP cyclique, font-ils partie de cette nouvelle famille ? Nul doute que de nombreux expérimentateurs dans le monde, armés de leurs oligonucléotides et de leurs machines à PCR, sont déjà en train de tenter d'amplifier des séquences correspondant aux régions les plus conservées entre les trois membres de ce nouveau type de récepteurs activant l'adénylate cyclase.

- [1. Vassart G, et al. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 985-90.]
- [2. Giros B, et al. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 609-10.]
- [3. Ishihira T, et al. *Embo J* 1991 ; 10 : 1635-41.]
- [4. Lin HY, et al. *Science* 1991 ; 254 : 1022-4.]
- [5. Jéppner H, et al. *Science* 1991 ; 254 : 1024-6.]

■■■ Clonage de récepteurs présomptifs du NMDA : il y en a un de trop ! Deux équipes, l'une japonaise de Kyoto [1] et l'autre américaine de Lawrence, dans le Kansas [2], rapportent, dans le même numéro de *Nature*, le clonage d'ADN complémentaire, codant pour le récepteur du NMDA. La difficulté est que les deux clones sont totalement différents. L'équipe japonaise a utilisé la méthode du clonage par expression dans les œufs de xénope.

Le principe en est, rappelons-le, de transcrire *in vitro* des groupes de clones d'ADNc en ARNm qui sont ensuite injectés dans les œufs de xénope. Ceux-ci sont testés par électrophysiologie : production d'un courant dû à l'ouverture du canal NMDA lorsque les œufs sont soumis à une différence de potentiel fixe et traités par le NMDA. Ce courant est bloqué par le magnésium. Le fractionnement des clones appartenant au groupe ayant donné une réponse positive permet d'aboutir, en fin de compte, à l'isolement de l'ADNc codant pour le récepteur. Celui-ci a le potentiel de coder pour une protéine de 105 kDa possédant quatre segments transmembranaires et ressemblant légèrement au récepteur AMPA/kainate (*m/s* n° 10, vol. 7, p. 1098). Ce clone hybride avec deux espèces d'ARN messagers de 4,2 et 4,4 kb trouvés dans différentes régions du cerveau, notamment l'hippocampe, l'hypothalamus et le bulbe olfactif. En revanche, l'équipe américaine a obtenu ses clones par la voie classique remontant de la protéine au gène. Une protéine liant le NMDA ou des ligands similaires a été purifiée et utilisée pour fabriquer des anticorps. Ceux-ci ont alors servi à cribler une banque d'expression d'ADN complémentaire d'hippocampe de rat dans *E. Coli*. Le clone d'ADNc obtenu a le potentiel de coder pour une protéine de 57 kDa ayant quatre segments transmembranaires présomptifs. Cette protéine ne serait, en fait, que l'une des quatre sous-unités nécessaires à la reconstitution d'un récepteur du NMDA fonctionnel, selon les travaux des auteurs. Ceux-ci ont, en effet, montré qu'un récepteur-canal fonctionnel ne pouvait être reconstitué dans des liposomes qu'à l'aide de quatre types de protéines différentes se liant au NMDA. Il n'est donc pas étonnant qu'il ne soit pas possible, avec le seul ADNc isolé jusqu'à présent, d'induire dans des cellules transfectées, l'apparition d'un récepteur NMDA. Un ARNm d'environ 1,8 kb est reconnu par l'ADNc dans le cerveau, surtout dans l'hippocampe et le cervelet. La

comparaison de la séquence de la protéine codée par l'ADNc cloné avec les séquences d'autres protéines ne révèle cependant de faibles analogies qu'avec un collagène et la γ -glutamyl transpeptidase, mais pas avec d'autres récepteurs. Ces données peuvent permettre d'être sceptique sur l'identité de l'ADNc isolé par Kumar *et al.* [2]. Quoi qu'il en soit, une de ces deux équipes a, très probablement, isolé un clone codant pour un sous-type de récepteur du NMDA, l'avantage dans les prévisions allant nettement à l'équipe japonaise. Le rôle extrêmement important de ces récepteurs du glutamate, le neurotransmetteur excitateur principal du cerveau, impliqué très probablement dans les lésions irréversibles faisant suite à des traumatismes ou à des anoxies cérébrales, explique l'intérêt de la possession d'un tel clone, prélude à des études de relations structure-fonction et à la caractérisation de familles d'antagonistes et d'agonistes utiles en neurobiologie et en thérapeutique.

[1. Moriyochi K, *et al. Nature* 1991 ; 354 : 31-6.]

[2. Kumar, *et al. Nature* 1991 ; 354 : 70-3.]

■■■ **Détection par PCR de cellules métastatiques circulantes.** La dissémination métastatique des cancers peut se faire par voie lymphatique et par voie sanguine. La dissémination hématogène est particulièrement fréquente dans certains types de cancers, par exemple les mélanomes, les ostéosarcomes, les cancers de la thyroïde, les séminomes, etc. Il suffit probablement d'un très petit nombre de cellules dans le sang circulant pour être à l'origine d'une métastase. Cependant, les techniques disponibles ne permettaient pas jusqu'alors de détecter de telles cellules cancéreuses dans la circulation. Certaines d'entre elles ont un phénotype très particulier, marqué par la présence d'ARN messagers qui ne sont pas normalement détectables dans les leucocytes.

C'est ainsi que l'expression du gène de la tyrosinase est très spécifique des cellules du mélanome. Une équipe anglaise de Leeds [1] vient de démontrer qu'il était possible de détecter une cellule de mélanome dans deux millilitres de sang grâce à la technique d'amplification *in vitro* d'ADN, dite de PCR. Les leucocytes de 2 millilitres de sang des malades sont isolés, leur ARN est purifié et copié en ADNc par la transcriptase inverse. Une réaction de PCR spécifique de la séquence nucléotidique codant pour la tyrosinase est alors entreprise. Ce test s'est révélé positif chez quatre parmi sept malades explorés et chez aucun des huit témoins. La présence de cellules cancéreuses circulantes étant probablement associée à un mauvais pronostic, un tel test pourrait être une indication de l'entreprise, après traitement chirurgical, d'une chimiothérapie complémentaire. Il est probable que d'autres types de cellules cancéreuses sont accessibles à cet examen qui pourrait par conséquent, dans l'avenir, faire partie du bilan préthérapeutique de nombreux types de tumeurs. Des études complémentaires sont néanmoins indispensables pour préciser la valeur de la corrélation entre ce test et le risque de métastases.

[1. Smith B. *Lancet* 1991 ; 338 : 1227-9.]

■■■ **Très près d'essais cliniques du NGF (*nerve growth factor*) dans la maladie d'Alzheimer.** Plusieurs équipes américaines poursuivent, actuellement, un programme de recherche systématique visant à définir les conditions d'un essai clinique d'adminis-

tration intracérébrale au long cours du NGF (*nerve growth factor*) chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Les objectifs de ce programme ont été clairement exprimés par un comité *ad hoc*, réuni il y a deux ans au *National Institute of Aging* [1], qui a établi cinq pré-requis : essais concluants chez le primate non humain ; source abondante de NGF humain ; technique d'administration au long cours ; évaluation de la toxicité ; définition des doses efficaces. Le deuxième problème est à présent résolu par la production massive de NGF recombinant humain, notamment par Genentech [2]. L'équipe de Rusty Gage (UC San Diego, CA, USA) répond aujourd'hui à d'autres points en montrant [3] que l'administration péri-septale de rhNGF (*recombinant human NGF*) chez le primate bloque la dégénérescence des neurones cholinergiques du septum provoquée par la section axonale, et facilite même la repousse d'axones cholinergiques. L'administration par mini-pompe osmotique a été maintenue 4 semaines dans ce cas, mais d'autres expériences ont déjà été réalisées sur des temps nettement plus longs. Les doses – efficaces – utilisées ici n'ont apparemment entraîné aucune toxicité. L'équipe de Gage a, ces dernières années, accumulé les résultats positifs concernant l'action du NGF administré chez le rongeur non seulement sur les neurones dont l'axone a été sectionné mais aussi chez des animaux qui présentaient spontanément une atteinte des fonctions supérieures au cours du vieillissement, un modèle qui se rapproche sans doute plus de la pathologie humaine. La confirmation des résultats présentés ici chez des primates âgés ayant une atteinte des fonctions supérieures – prochaine étape de cette équipe – pourrait donc bien être la dernière avant que ne soient lancés les premiers essais cliniques.

[1. Phelps CH, *et al. Neurobiol Aging* 1989 ; 10 : 205-7.]

[2. Barnett J, *et al. Exp Neurol* 1990 ; 110 : 11-24.]

[3. Tuszinski MH, *et al. Ann Neurol* 1991 ; 30 : 625-36.]