

Des mutations retrouvées pour la première fois dans une guanylyl cyclase (*retGC*) responsables d'une cécité néonatale : l'amaurose congénitale de Leber

L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est la forme la plus sévère et la plus précoce des rétinopathies héréditaires puisqu'elle est responsable d'une cécité néonatale ou d'un handicap visuel gravissime dès les premiers mois de vie.

Le diagnostic est porté très tôt devant un nourrisson présentant des signes évidents de malvoyance profonde dont le fond d'œil est normal mais dont l'électrorétinogramme (ERG) est totalement plat, témoignant du dysfonctionnement majeur des deux types de photorécepteurs.

Cette affection, toujours récessive autosomique, représente au moins 5% de l'ensemble des dystrophies rétiniennes. L'hétérogénéité de cette maladie a été suspectée depuis fort longtemps par l'observation d'unions entre sujets atteints ayant donné naissance à des enfants indemnes [1].

En 1995, tirant avantage de l'existence, dans notre échantillon, de familles consanguines originaires du Maghreb (suggérant la faible fréquence du gène responsable), nous avons utilisé l'élégante méthode de la cartographie par homozygotie, localisé le premier gène responsable d'ACL sur le bras court du chromosome 17 (17p13, *LCA1*) et confirmé l'hétérogénéité génétique de la maladie puisque *LCA1* n'était impliqué que dans les seules familles originaires d'Afrique du Nord [2, 3].

Très récemment, utilisant une méthodologie mixte de clonage positionnel et d'approche par gènes candidats, nous avons montré que le gène codant pour la guanylyl cyclase spécifique de la rétine (*RetGC*) était contenu dans le même intervalle physique que le gène *LCA1* [4]. Nous

avons d'ailleurs dès 1994, localisé le gène *RetGC* sur le chromosome 17p13.1 par FISH, grâce à un travail collaboratif avec le groupe de Pittler (Mobile, AL, USA) [5].

La structure génomique du gène *RetGC* n'était pas connue, seule la séquence de l'ADNc avait été publiée en 1992 [6]. Ce gène ne s'exprime pas dans les lymphocytes mais, par chance, la structure génomique de l'homologue murin, *GC-E*, a été rapportée en 1996 [7], et nous avons alors fait le pari que les structures génomiques de ces deux gènes devaient être très conservées.

Utilisant alors la méthode d'amplification de longs fragments d'ADN [8], nous avons choisi dans l'ADNc humain, des oligonucléotides encadrant les jonctions exon-intron putatives calquées sur celles de *GC-E*. Ainsi, nous avons déterminé la structure génomique de *RetGC* humain et confirmé que les organisations humaine et murine étaient comparables : 20 exons (1 et 20 non codants), 19 introns, jonctions superposables excepté pour les introns 1 et 19.

Une recherche de mutations a alors été entreprise chez nos patients atteints d'ACL, tout d'abord par SSCP puis par séquençage direct du gène [4].

A ce jour, des mutations ont été identifiées dans 7 familles indépendantes. Premièrement, deux délétions homozygotes d'une cytosine dans l'exon 2 (positions nt 460 et nt 693) conduisant à l'apparition prématurée d'un codon stop (toujours dans l'exon 2) furent trouvées dans deux familles consanguines originaires de Tunisie, l'une juive sépharade, l'autre arabe.

Deuxièmement, la même mutation faux sens homozygote (F589S) fut trouvée dans 3 familles arabes indépendantes, originaires d'Algérie. Enfin, très récemment, deux autres mutations ont été identifiées, une mutation faux sens homozygote dans l'exon 15 pour une famille turque consanguine, ce qui étend l'origine géographique des mutations du gène *RetGC* au-delà du Maghreb et cela d'autant plus que la seconde mutation, dans l'exon 17, concerne une famille consanguine pakistanaise (données non encore publiées). La guanylyl cyclase spécifique des photorécepteurs catalyse la transformation du GTP en GMP cyclique dans la membrane des disques. En conséquence, les mutations de *RetGC* engendrent un défaut de production de GMPc dans la rétine, entraînant la fermeture des canaux cationiques dépendant du GMPc [4].

La transduction du signal visuel, de l'absorption du photon par le rétinol dans la rhodopsine à la production du premier signal électrophysiologique à travers la membrane de la cellule photoréceptrice, nécessite l'intervention d'une dizaine de protéines. Parmi celles-ci, quatre protéines : la rhodopsine, la transducine, la phosphodiesterase, le canal dépendant du GMPc, avec deux nucléotides, le GTP et le GMPc, suffisent à rendre compte de la phase montante du signal d'hyperpolarisation de la membrane cellulaire du segment externe (*figure 1*). Les canaux dépendants du GMPc de la membrane cellulaire, dernier élément de la chaîne de transduction, se ferment rapidement en réponse à la chute de concentration de GMPc dans le cyto-

plasme. Lorsque, après une illumination, les canaux se ferment par suite de l'activation de la phosphodiesterase et de la baisse du GMPc qu'elle induit, l'entrée du calcium est bloquée, tout comme celle du sodium, mais l'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ reste actif, et donc la concentration du calcium interne chute: la baisse du GMPc, signal inducteur de la réponse hyperpolarisante, entraîne une baisse de la concentration en Ca^{2+} interne, signal régulateur [9, 10]. Il est important de noter que ce deuxième signal est décalé dans le temps car il n'est engendré que progressivement, par l'activité continue de l'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$, après la fermeture des canaux et la montée de la vague d'hyperpolarisation. Le premier effet bien caractérisé de la baisse de concentration de calcium dans les photorécepteurs a été la stimulation de la guanylyl cyclase qui accélère la synthèse du GMPc, ce qui contrebalance l'activité de la phosphodiesterase et tend donc à restaurer une concentration de GMPc suffisante pour ouvrir les canaux (figure 1). En conséquence, dans l'ACL, le phénomène de transmission au niveau des cônes et des bâtonnets est considérablement altéré en raison de la fermeture permanente des canaux cationiques dépendants du GMPc avec hyperpolarisation constante de la membrane. La concentration de GMPc dans les photorécepteurs ne peut retrouver sa valeur d'obscurité [11], ce qui équivaut fonctionnellement à une illumination permanente des photorécepteurs dès les toutes premières étapes de leur développement.

Il est surprenant de constater que pour toutes les rétinites pigmentaires, dont le gène est identifié, une augmentation de la concentration en GMPc et une mort des photorécepteurs par apoptose ont été mis en évidence. En revanche, dans l'amaurose congénitale de Leber, l'altération du gène *RetGC* conduit à une absence de GMPc dans la rétine. En outre, les études microscopiques effectuées chez un nourrisson de 16 mois atteint de la maladie de Leber, et décédé accidentellement, ont montré une immaturité de toutes les structures de la rétine neurosensorielle avec des

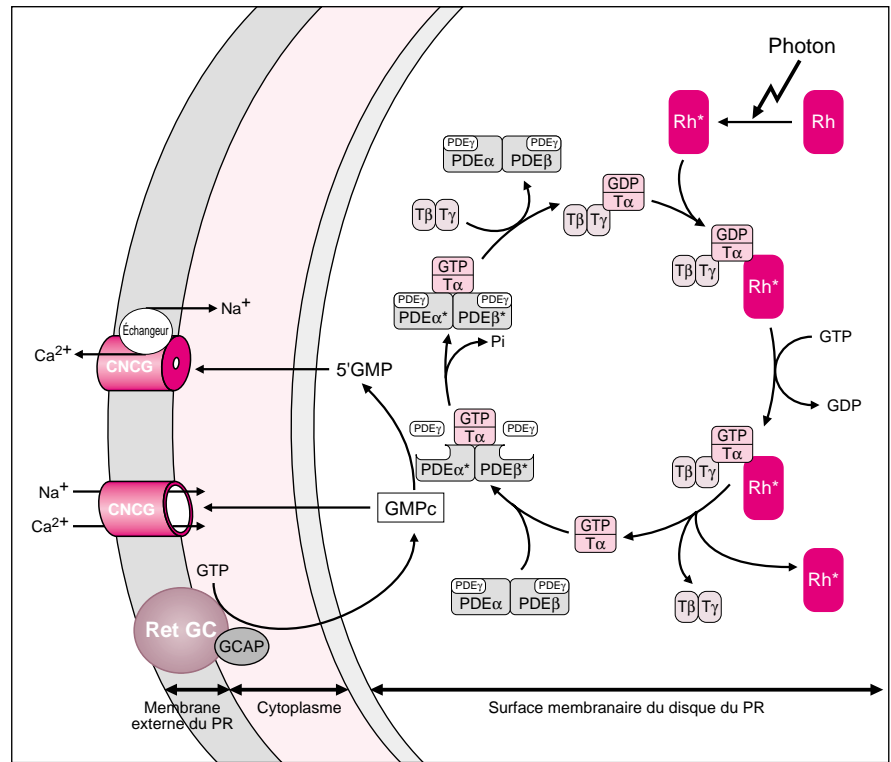


Figure 1. **Rôle de la guanylyl cyclase rétinienne dans la cascade de la phototransduction.** L'absorption du photon par la rhodopsine (*Rh*) active une protéine *G*, la transducine (*T*). Son activation correspond à l'échange $\text{GDP} \rightarrow \text{GTP}$. Elle est constituée de trois sous-unités $\text{T}\alpha$, $\text{T}\beta$, $\text{T}\gamma$. C'est $\text{T}\alpha$ qui fixe le GDP et qui va à son tour activer la phosphodiesterase *PDE* qui est constituée également de trois sous-unités ($\text{PDE}\alpha$, $\text{PDE}\beta$, $\text{PDE}\gamma$). L'astérisque* indique que la protéine est activée. La *PDE* activée peut hydrolyser les molécules de guanosine 3'5' monophosphate cyclique (*GMPc*) en guanosine 5' monophosphate ($5'\text{GMP}$). La chute de la concentration cytosolique du *GMPc* provoque la fermeture des canaux cationiques (*CNCG*: cyclic nucleotide channel gene) de la membrane du segment externe du photorécepteur (*PR*) à l'origine de son hyperpolarisation. C'est la guanylyl cyclase spécifique des photorécepteurs (*RetGC*: retinal guanylyl cyclase) qui, sous l'effet d'une protéine activatrice (*GCAP*: guanylyl cyclase activating protein) catalyse la transformation du GTP en *GMPc* dans la membrane externe, permettant la réouverture des canaux. Les mutations de *RetGC*, engendrant un défaut de production de *GMPc*, entraînent la fermeture permanente des canaux cationiques: l'hyperpolarisation est permanente, empêchant toute sensibilité à la lumière.

noyaux cellulaires intacts [12], attestant de l'absence de processus apoptotique. Ainsi, serait apporté le premier argument en faveur d'une corrélation entre la concentration de *GMPc* et l'apoptose des photorécepteurs.

Au demeurant, c'est la première fois qu'est rapportée une altération dans une guanylyl cyclase et nos résultats soulèvent l'hypothèse que des anomalies similaires puissent, d'une part,

expliquer d'autres défauts sensoriels, et que, d'autre part, des altérations de protéines régulatrices ou activatrices de *RetGC* puissent expliquer les cas d'amaurose congénitale de Leber non liées au chromosome 17p.

Enfin, le défaut de *GMPc* chez les patients atteints d'ACL pourrait être rapproché du défaut métabolique observé dans la souche de poulet *rd/rd*. En effet, ces animaux sont

aveugles dès l'éclosion avec un ERG éteint, contrastant avec l'absence d'altération ophtalmoscopique de la rétine, comme c'est également le cas chez les nouveau-nés atteints d'ACL [13]. La dégénérescence des photorécepteurs du poulet *rd/rd* débute environ dix jours après l'éclosion et évolue rapidement puisque, six mois plus tard, toutes les structures rétiniennes ont dégénéré. Il est très important de souligner que des études immunologiques révèlent une absence totale de guanylyl cyclase chez le poulet *rd/rd* suggérant fortement le même mécanisme physiopathologique que dans l'ACL [14]. Ce poulet pourrait donc représenter un excellent modèle animal pour toutes les recherches à visée thérapeutique qui seront conduites pour cette maladie.

I.P.
J.M.R.
A.M.
J.K.

1. Kaplan J, Rozet J, Gerber S, Camuzat A, Souïed E, Bonneau D, Larget-Piet D, Dollfus H, Dufier J, Briard M, Frézal J, Munnich A. Des gènes pour les dystrophies rétiniennes des enfants. *Med Sci* 1995; 11: 325-35.
2. Camuzat A, Dollfus H, Rozet JM, Gerber S, Bonneau D, Bonnemaïson M, Briard ML, Dufier JL, Ghazi I, Leowski C, Weissenbach J, Frézal J, Munnich A, Kaplan J. A gene for Leber's congenital amaurosis maps to chromosome 17p. *Hum Mol Genet* 1995; 8: 1447-52.
3. Camuzat A, Rozet JM, Dollfus H, Gerber S, Perrault I, Weissenbach J, Munnich A, Kaplan J. Evidence of genetic heterogeneity of Leber's congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13. *Hum Genet* 1996; 97: 798-801.
4. Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Châtelin S, Souïed E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frézal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nature Genet* 1996; 14: 461-4.
5. Oliveira L, Miniou P, Viegas-Pequignot E, Rozet JM, Dollfus H, Pittler S. Human retinal guanylate cyclase (GUC2D) maps to chromosome 17p13.1. *Genomics* 1994; 22: 478-81.
6. Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gillet NA, Coeddel DV, Lowe DG. Molecular cloning of a retina-specific membrane guanyl cyclase. *Neuron* 1992; 9: 727-37.
7. Yang RB, Fülle HJ, Garbers DL. Chromosomal localization and genomic organization of genes encoding guanylyl cyclase receptors expressed in olfactory sensory neurons and retina. *Genomics* 1996; 31: 367-72.
8. Reynier P, Malthiery Y. PCR longue: progrès récents et application à l'étude des délétions de l'ADN mitochondrial. *Med Sci* 1996; 12: 1011-6.
9. Chabre M, Dettere P. Molecular mechanism of visual transduction. *Eur J Biochem* 1989; 179: 255-66.
10. Dizhoor AM, Lowe DG, Olshevshaya EV, Laura RP, Hurley JB. The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, retGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and soluble activator. *Neuron* 1994; 12: 1345-52.
11. Lolley RN, Lee RH. Cyclic GMP and photoreceptor function. *FASEB J* 1990; 4: 3001-8.
12. Mizuno K, Takei T, Sears ML, Peterson WS, Carr RE, Jampol LM. Leber's congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol* 1977; 83, 1: 32-42.
13. Lee NR, Ulshofer RJ, Cohen RJ. cGMP in the *rd* chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28 (suppl): 344.
14. Semple-Rowand SL, Buczylo J, Paleczewski K, Baehr W. Abnormal expression of GCAP1 and photoreceptor guanylate cyclase *rd* chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37 (suppl): 3779.