

## La maladie du sirop d'érable : mécanismes moléculaires

La maladie du sirop d'érable résulte de l'incapacité pour l'organisme de cataboliser les trois acides aminés branchés — valine, leucine et iso-leucine. Elle se manifeste par des troubles digestifs et neurologiques ; l'acidocétose peut être rapidement mortelle si un traitement à base de restriction alimentaire de ces acides aminés n'est pas institué. L'affection doit son nom à l'odeur de l'urine des enfants atteints. Elle est transmise selon le mode récessif autosomique [1]. Le premier stade du catabolisme des acides aminés branchés est une transamination qui aboutit à la formation des acides cétoniques correspondants. C'est la décarboxylation de ces cétoacides qui constitue le temps critique. La réaction s'effectue en plusieurs étapes, mettant en jeu un complexe pluri-enzymatique. Dans une première étape, l'acide cétonique est décarboxylé par une enzyme E1 ; il est ensuite transféré sur l'acétyl CoA par une enzyme E2, par l'intermédiaire de l'acide lipoïque\* ; une enzyme E3, flavoprotéine dite lipoamide déshydrogénase, réoxyde le lipoate. La réaction d'ensemble peut s'écrire :



Le complexe est situé dans les mitochondries où les acides cétoniques doivent être importés. Il est formé de trois ensembles : un ensemble central E2 qui porte le groupe lipoïque connecté à E1, une décarboxylase à thiamine, et à E3. La régulation est dévolue à E1, formée elle-même de

\* L'acide lipoïque est un acide à 8 carbones comportant une liaison disulfure, et qui possède, en équilibre, les formes disulfure oxydée et sulfhydryle réduite.

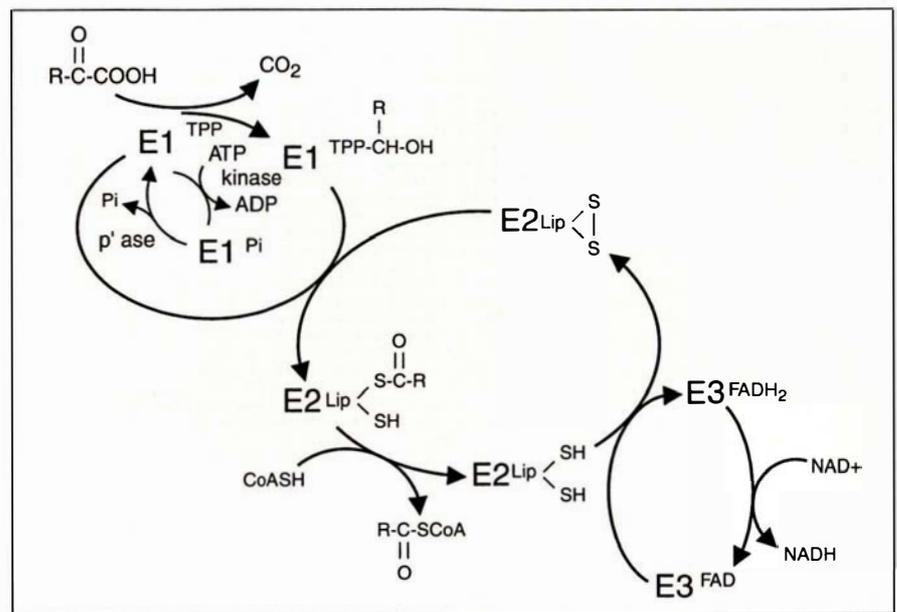


Figure 1. **Enzymes et réactions du complexe des déshydrogénases des acides cétoniques dérivés des acides aminés branchés.**

deux chaînes E1 $\alpha$  et E1 $\beta$ , et qui est capable d'être activée par déphosphorylation et inactivée par phosphorylation. L'ensemble forme un complexe qui compte probablement 60 sous-unités [2].

Depuis 1989, on a réussi à cloner les ADNc des quatre sous-unités. Leur connaissance est encore incomplète ; nous avons résumé dans le *Tableau I*

les données actuellement connues. On voit notamment que tous ces polypeptides, qui doivent pénétrer dans la mitochondrie, possèdent donc un peptide signal (ou *peptide leader*).

**Anomalies moléculaires.** Des anomalies ont été découvertes pour trois des sous-unités du complexe : E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ , E2.

Tableau I				
CARACTÉRISTIQUES CONNUES DES SOUS-UNITÉS				
	Taille (kDa)	Nombre total d'acides aminés	Peptide signal	ARNm (kb)
E1 $\alpha$	46	400	43	1,8
E1 $\beta$	37	392	50	
E2	52	477	56	2,2 et 2,4
E3	55	509	35	

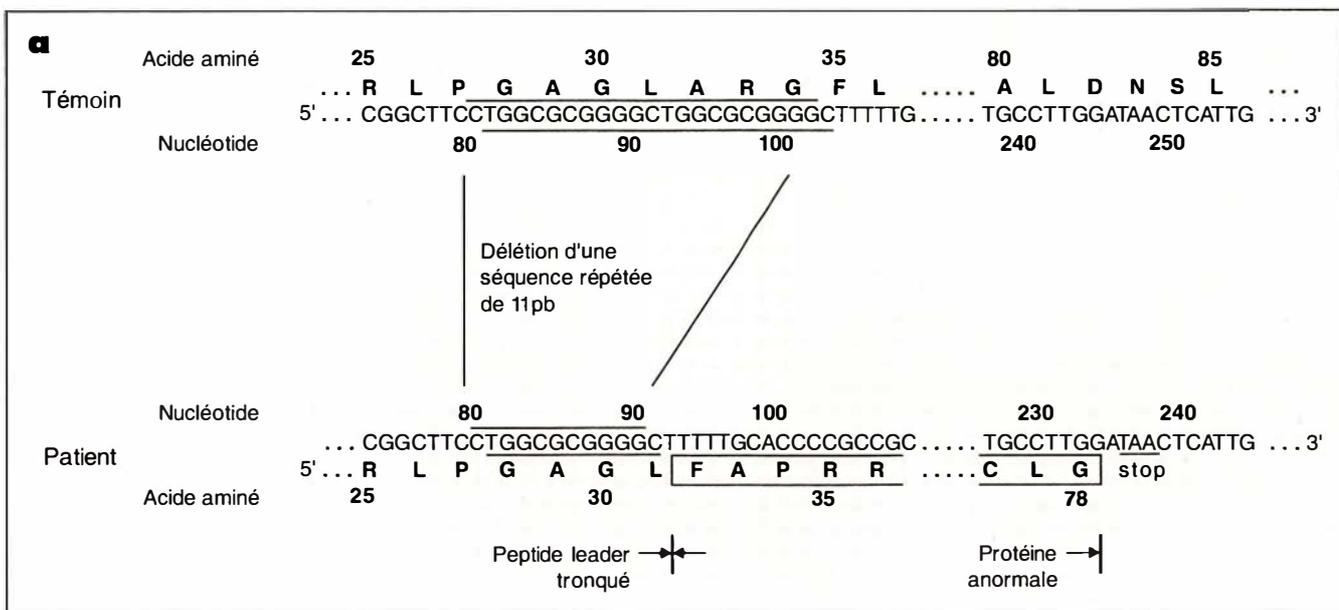
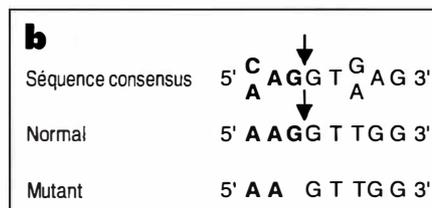


Figure 2a. **Délétion de 11 pb et ses conséquences dans un déficit en E1.** (D'après [5].)

Figure 2b. **Déficit en E2 avec élimination d'un exon : séquence du témoin et du mutant au niveau du site d'épissage.** La flèche indique le point de rupture normal ; les lettres rouges représentent la partie exonique. (D'après [6] modifié.)



(1) Les déficits les plus fréquents atteignent l'enzyme E1.

(a) Deux groupes ont décrit des mutations de E1 $\alpha$  :

- Zhang *et al.* [3] (Indianapolis, IN, USA) ont étudié un malade présentant un taux de 50 % de la normale d'ARNm mais seulement 12 % d'activité, qui s'est avéré hétérozygote pour deux mutations : un changement T  $\rightarrow$  A, provoquant un changement Tyr  $\rightarrow$  Asn en position 394 ; l'autre, non identifiée, supprimant complètement la production d'ARNm et donc de protéine.

- Matsuda *et al.* (Kumamoto, Japon) ont décrit, dans deux lignées cellulaires provenant de malades, la même mutation T  $\rightarrow$  A au niveau de l'acide aminé 394 que dans le cas de Zhang *et al.* [4].

(b) Ce même groupe de Matsuda [5] a analysé une famille dont le proposant était déficient à la fois en E1 $\alpha$  et E1 $\beta$ . Si la séquence d'E1 $\alpha$  était normale, une délétion de 11 pb fut détectée dans le gène E1 $\beta$ , dans la région codant pour le peptide signal

nécessaire pour reconnaître la cible mitochondriale. Elle se situait, dans le premier exon, au niveau d'une répétition directe en tandem (figure 2). Elle entraînait un changement de phase et la synthèse d'une protéine tronquée. Un frère et une sœur étaient également homozygotes pour la mutation.

De ces observations, il ressort que les deux sous-unités de E1 sont indispensables pour stabiliser l'ensemble E1, tout déficit en une des sous-unités entraînant secondairement une instabilité du partenaire.

(2) Des déficits en protéine E2 ont été décrits ; la première lésion moléculaire précisée est encore due au groupe de Matsuda [6]. Chez le sujet déficient, la recherche de l'anomalie était orientée par la disparition de la bande E2 de 52 kDa à l'électrophorèse, remplacée par une bande de 49 kDa de faible intensité. Une délétion de 78 bases dans l'ARNm ne changeait pas la phase de lecture, mais donnait naissance à une protéine qui avait perdu 26 acides ami-

nés (les acides aminés 253 à 278) rendant la protéine à la fois moins stable et inactive. L'analyse précise au niveau du gène révéla un mécanisme particulier : la délétion d'une seule base G au voisinage, en 5', d'une jonction exon-intron modifie la séquence consensus et entraîne l'élimination de l'exon entier de 78 pb. On sait que des anomalies de la zone d'épissage sont des causes fréquentes de maladies génétiques. Il semble toutefois que le départ d'un G, situé dans la séquence consensus, mais ne supprimant pas le dinucléotide indispensable GT, n'avait jamais été reconnu comme cause d'une anomalie génétique, alors que des mutations ponctuelles à ce niveau ont déjà été décrites dans plusieurs gènes, entraînant également l'excision anormale d'un exon des transcrits primitifs [7]. Dans le cas que nous décrivons, il s'est synthétisé une protéine trop petite. Moins abondante que normalement, cette protéine était également inactive, puisque le déficit de ce sujet était aussi profond que celui d'un

malade totalement dépourvu de protéine E2.

De l'ensemble des résultats que nous venons de rapporter, il ressort que le déficit en l'une des sous-unités est suffisant pour provoquer le tableau clinique de la maladie ; la gravité du syndrome est comparable, quelle que soit la lésion moléculaire qui en est à l'origine ■

J.C. D.

## RÉFÉRENCES

1. Danner DJ, Elsas II LJ. Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York : McGraw-Hill, 1989 ; 671-92.
2. Reed LJ, Hackert ML. Structure-function relationship in dihydrolipoamide acyltransferases. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 8971-4.
3. Zhang B, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA. Evidence for both a regulatory mutation and a structural mutation in a family with maple syrup urine disease. *J Clin Invest* 1989 ; 83 : 1425-9.
4. Matsuda I, Nobukuni Y, Mitsubichi H, et al. A T to A substitution in the E1 subunit gene of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex in two cell lines derived from Mennonite maple syrup urine disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 172 : 646-51.
5. Nobukuni Y, Mitsubichi H, Akoboshi I, et al. Maple syrup urine disease. Complete defect of the E1 $\beta$  subunit of the branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex due to a deletion of an 11-bp repeat sequence with encodes a mitochondrial targeting leader peptide in a family with the disease. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1862-6.
6. Mitsubichi H, Nobukuni Y, Akoboshi I, et al. Maple syrup urine disease caused by a partial deletion in the inner E2 core domain of the branched chain keto acid dehydrogenase complex due to aberrant splicing. *J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1207-11.
7. Akli S, Chelly J, Mezard C, Gandy S, Kahn A, Poenaru L. A G to A mutation at position - 1 of a 5' splice site in a late infantile form of Tay-Sachs disease. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 7324-30.

## ■■■■ BRÈVE ■■■■

■■■■ **Diabète insulino-dépendants obtenus par infection de souris transgéniques exprimant, dans le pancréas, un des antigènes du virus infectant.** Le diabète insulino-dépendant de type I (IDDM) ou diabète juvénile résulte de la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Une réponse auto-immune, l'expression d'haplotypes particuliers du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et diverses infections virales sont souvent proposées comme jouant un rôle dans l'apparition ou le développement de cette maladie dont la transmission héréditaire complexe signe, en outre, la multiplicité des gènes impliqués. La mise en jeu d'une réaction auto-immune pose le problème de la mise en place de la tolérance immunitaire vis-à-vis de protéines non exprimées dans le thymus et de sa perturbation. Le ciblage par transgénèse de protéines variées dans les cellules  $\beta$  du pancréas, a permis de créer divers modèles de diabète (*ms/n° 7, vol. 4, p. 444*). Cependant, dans ces cas, l'hyperglycémie et l'hypo-insulinémie étaient les conséquences de perturbations métaboliques de la cellule  $\beta$  (provoquées par l'expression de molécules de classes I et II) et l'insulite caractéristique de l'agression auto-immune observée dans les IDDM était absente. De nouveaux modèles viennent d'être créés par P. Ohashi (Zurich, Suisse) en collaboration avec B. Malissen (Marseille Luminy, France) [1] et M. Oldstone (La Jolla, CA, USA) [2], qui, par des approches similaires, apportent des arguments en faveur d'une tolérance périphérique n'impliquant pas de délétion (*ms suppl. au n° 1, vol. 5, p. 25*) ou d'anergie clonale (*ms n° 2, vol. 6, p. 164*), mais une absence d'activation appropriée des cellules T cytotoxiques dirigées contre des antigènes du soi. En situation d'activation, la tolérance immunitaire pourrait s'effondrer et la maladie auto-immune se développer. Ces conclusions ont été déduites de l'étude de souris transgéniques exprimant la glycoprotéine virale GP du

virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) dans les cellules  $\beta$  du pancréas et de doubles transgéniques exprimant, outre la protéine GP, un récepteur T capable de la reconnaître dans le contexte d'une molécule de classe I du CMH. Ce dernier modèle a permis d'affirmer que les cellules T spécifiques de la protéine GP n'avaient pas subi de délétion clonale et que la tolérance n'était pas liée à une diminution de l'expression du récepteur T ou des molécules auxiliaires à la surface des cellules CD8<sup>+</sup>. L'infection de ces souris par le LCMV entraîne d'ailleurs une activation de ces cellules T et une infiltration lymphocytaire. Chez les animaux non infectés, l'absence d'activation pourrait être expliquée par au moins deux phénomènes : (1) les cellules  $\beta$  langerhans normales, n'exprimant pas les molécules de classe II du CMH, ne pourraient présenter les peptides GP aux cellules auxiliaires ; (2) d'autres signaux, indispensables à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, pourraient être absents. En revanche, après infection, l'activation de ces cellules T anti-GP serait déclenchée à la faveur d'une présentation des peptides viraux par des cellules dont la fonction normale est de présenter les antigènes (macrophages et lymphocytes B). Ces cellules présentatrices participent en effet à la réaction immunitaire en sécrétant des lymphokines indispensables à l'activation des cellules effectrices. La réaction auto-immune vis-à-vis des cellules  $\beta$  exprimant l'antigène viral pourrait alors se faire, provoquant un diabète ayant toutes les caractéristiques d'un diabète auto-immun. Un mécanisme similaire pourrait être à l'origine des maladies auto-immunes liées à l'activité de cellules T cytotoxiques vis-à-vis de cellules exprimant un antigène dit périphérique, c'est-à-dire n'ayant jamais été exprimé dans le thymus.

[1. Ohashi PS, et al. *Cell* 1991 ; 65 : 305-17.]

[2. Oldstone MBA, et al. *Cell* 1991 ; 65 : 319-31.]

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ Le produit du gène *bcr* est une protéine GAP active sur un membre de la famille Ras. Il existe au moins une trentaine de protéines appartenant à la famille des petites G-protéines de type Ras. Ces G-protéines sont douées d'une activité GTPasique intrinsèque qui est stimulée par leur association à des protéines GAP (*GTPase activating proteins*). La protéine GAP spécifique de  $p21^{ras}$  et le produit du gène NF1 altéré chez les malades souffrant de neurofibromatose de type 1 sont, chez les mammifères, les deux premiers exemples connus de ce type de molécules (*m/s n° 7, vol. 6, p. 703 et n° 8, vol. 6, p. 815*). Des chercheurs britanniques de Londres (GB)[1] ont isolé d'une rate humaine une protéine GAP de 29 kDa semblant être active sur la protéine  $p21^{ras}$ , mais inactive sur  $p21^{rho}$ . La séquence protéique partielle de cette molécule révèle des similitudes avec l'extrémité carboxyterminale du produit du gène *bcr*, partenaire du gène *abelson* dans les translocations spécifiques de la leucémie myéloïde chronique. Des similitudes étaient également observées avec une autre protéine précédemment caractérisée, la n-chimaerine. La n-chimaerine et la partie carboxyterminale de la protéine Bcr furent alors exprimées par des bactéries recombinées et les produits testés quant à leur activité de type GAP sur plusieurs membres de la famille Ras :  $p21^{rho}$  et  $p21^{rac}$ . Les protéines recombinantes Bcr et n-chimaerine se révélèrent inactives sur  $p21^{rho}$  mais, en revanche, extrêmement actives sur  $p21^{rac}$ . Le rôle de  $p21^{rac}$  n'est pas connu, mais son appartenance à la famille *ras* suggère qu'elle pourrait avoir des fonctions de régulation. Dans les leucémies myéloïdes chroniques, la translocation 9 ; 22, engendrant le chromosome Philadelphie, aboutit à la synthèse d'une protéine hybride Bcr-Abelson (*m/s n° 7, vol. 1, p. 390*). L'activité de la tyrosine kinase Abl est stimulée alors que sa localisation subcellulaire (normalement nucléaire, mais membranaire dans la LMC) est

modifiée par sa fusion à l'extrémité aminoterminal de Bcr. Cette protéine hybride ne comporte pas la région de Bcr dotée de l'activité GAP. Cependant, on ne peut éliminer l'hypothèse selon laquelle le produit du réarrangement réciproque, supposé contenir la partie aminoterminal de Bcr, soit également fonctionnelle chez les malades ayant un chromosome Philadelphie. Le rôle d'une telle protéine hybride, susceptible de perturber la régulation de  $p21^{rac}$ , dans la leucémogénèse mérite par conséquent d'être réévalué. [1. Diekmann D, *et al. Nature* 1991 ; 351 : 400-2.]

■■■■ Clonage de l'ADNc du récepteur de l'angiotensine II. L'enzyme rénale, la rénine, convertit l'angiotensinogène en angiotensine I, elle-même transformée en angiotensine II active par l'enzyme de conversion synthétisée par le poumon. L'angiotensine II (AT II) a de nombreux effets, cardio-vasculaires, neuronaux et sur la régulation du transport électrolytique. L'activité sur le système cardio-vasculaire dépend de récepteurs de type I. L'ADNc codant pour ce récepteur vient d'être cloné par deux équipes, l'une japonaise de Tokyo [1], et l'autre américaine d'Atlanta (GE, USA) [2]. Les deux équipes ont utilisé des techniques extrêmement proches : confection d'une banque d'ADN complémentaire de surrénale bovine dans le premier cas, de cellules musculaires lisses de rat dans le second, puis transfection de cellules COS, naturellement dépourvues de récepteurs de l'AT II, par l'ADN de cette banque fabriquée dans des vecteurs d'expression. L'étape suivante consiste à détecter la liaison d'un antagoniste radioactif de l'AT II à la membrane des cellules COS exprimant le récepteur. Ce récepteur a 359 acides aminés et comporte les 7 segments transmembranaires caractéristiques de la super-famille des récepteurs couplés aux G-protéines ; le traitement par

l'AT II des clones de cellules COS l'exprimant provoque une augmentation du calcium et de l'inositol-1,4,5-triphosphate, ce qui suggère un couplage avec une phospholipase C, la signalisation passant par l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol. [1. Sasaki K, *et al. Nature* 1991 ; 351 : 230-2.] [2. Murphy DJ, *et al. Nature* 1991 ; 351 : 233-6.]

■■■■ Le facteur vasorelaxant d'origine endothéliale (EDRF) atténue l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II sur l'artériole préglomérulaire. Ito *et al.* (Henry Ford Hospital, Detroit, MI, USA) ont mis au point une technique remarquable d'isolement et de microperfusion d'une artériole afférente (ou préglomérulaire) et du glomérule situé en aval, chez le lapin [1]. La perfusion est effectuée à une pression de 60 mmHg. L'angiotensine II (A II), à la dose de 0,1  $\mu$ M, dans le bain et dans le perfusé, entraîne une diminution du diamètre de l'artériole d'environ 50 % ; la vasoconstriction est segmentaire et s'efface en grande partie en 1 minute environ (au contraire, la noradrénaline produit une vasoconstriction sur toute la longueur de l'artériole, persistant à 3 minutes). La réexposition de l'artériole à l'A II s'accompagne d'une contraction moindre, témoignant d'une tachyphylaxie. Le prétraitement par le  $N^W$ -nitro-L-arginine (N-arg) qui inhibe la synthèse du monoxyde d'azote, NO (un EDRF), réduit légèrement le diamètre de l'artériole et surtout majore et prolonge l'effet vasoconstricteur de l'A II. Cependant il ne supprime pas la tachyphylaxie (qui n'est effacée que par un lavage avec une solution contenant un homogénat de rein, riche en angiotensinase). Ainsi, l'effet vasoconstricteur passager de l'A II pourrait être dû à la production d'EDRF alors que la tachyphylaxie résulterait de l'occupation prolongée des récepteurs. [1. Ito S, *et al. J Clin Invest* 1991 ; 87 : 1656-63.]