

Oligophrénine-2, une protéine Rab-GDI impliquée dans un retard mental non spécifique lié au chromosome X

Les retards mentaux non spécifiques liés au chromosome X (RMX) sont définis par un retard mental non progressif isolé (sans autres anomalies cliniques) transmis selon le mode dominant ou récessif lié au chromosome X. Ces retards mentaux sont répertoriés selon leur localisation génétique (locus) établie par des analyses de liaison; au moins une dizaine de locus non chevauchants ont ainsi été identifiés grâce aux études de liaisons génétiques réalisées sur plus de cinquante familles indépendantes.

À la recherche d'un gène...

Nous avons réalisé une étude de liaisons génétiques sur une famille (MRX48) présentant sept garçons atteints sur trois générations et des femmes transmettrices atteintes [1]. Le cas index de cette famille présente un retard mental sévère avec un langage incompréhensible à l'âge de 3 ans; les examens cliniques et complémentaires ne révèlent aucun autre signe clinique, biologique ou radiologique. La demi-sœur d'un autre garçon atteint de cette famille présente aussi un retard mental global, homogène, avec une certaine préservation des perceptions visuelles. Les autres sujets atteints de la famille présentent un retard mental modéré à sévère, sans dysmorphie.

L'analyse génétique, réalisée avec 30 marqueurs polymorphes partiellement ou totalement informatifs, a permis d'exclure la quasi-totalité du chromosome X puis de mettre en évidence une liaison génétique significative entre le phénotype retard mental et plusieurs marqueurs de la

région Xq28 (DXS8061 *lod score* = 2,74, *q* = 0) dans une région critique de 8-9 cM qui s'étend du marqueur DXS8011 au télomère. Cinq autres familles de retard mental non spécifique ont été localisées dans cette région: MRX3 [2], MRX16 (Moraine, Tours), MRX28, MRX25 [3] et MRX41 (Ropers, Pays-Bas).

Cette région ayant été bien étudiée sur le plan moléculaire au cours de ces dernières années [4], l'approche «gène candidat», qui consiste à désigner le meilleur gène susceptible d'être responsable d'une maladie génétique assignée à un intervalle génomique donné, parmi plusieurs gènes assignés à ce même intervalle, a été initialement privilégiée.

Parmi les différents gènes localisés dans cette région Xq28, le gène *GDI1*, l'homologue humain du gène bovin *smg p25A/Rab3A GDI* (*GDP dissociation inhibitor*), pouvait apparaître pour différentes raisons comme un excellent gène candidat. Premièrement, ce gène est exprimé, sous la forme d'un transcrite de 2,5 kb, essentiellement dans le cerveau embryonnaire et adulte [5]. Deuxièmement, il code pour une protéine Rab-GDI- α susceptible de régler l'attachement des protéines Rab (notamment Rab3) à la membrane des vésicules synaptiques et donc de moduler le transport vésiculaire [6] et la libération des neurotransmetteurs.

Dans le cadre d'une collaboration internationale (Italie, France, États-Unis, Pays-Bas, Australie) coordonnée par l'équipe italienne de Daniela Toniolo (Pavie), le séquençage systématique des 11 exons de ce gène a été entrepris chez les propositus des familles MRX3, 25, 28, 41 et 48 [7]. Une mutation non-sens R70X (C \rightarrow T

en position 366) a été retrouvée chez le propositus de la famille MRX48. La co-ségrégation de cette mutation avec la maladie a été confirmée par digestion avec l'enzyme DdeI dont un site est créé par la mutation (figure 1). Cette mutation aboutit à l'expression d'une protéine tronquée, instable, non détectée par *Western blot* dans les lymphoblastes [7]. Une mutation faux-sens L92P (T \rightarrow C en position 433) a été retrouvée chez le propositus de la famille MRX 41. *In vitro*, il a été démontré que la protéine mutée L92P, engendrée par mutagenèse dirigée, a une affinité six fois plus faible pour la protéine Rab3A que la protéine Rab-GDI- α sauvage [7]. Ce résultat suggère que cette mutation faux-sens devrait entraîner une altération du recyclage des protéines Rab et de l'attachement des vésicules synaptiques à la membrane. En outre, cette mutation faux-sens altère la dissociation de la protéine Rab3A des synaptosomes de cerveau de rat. L'identification de ces mutations, non retrouvées sur plus de 100 chromosomes X normaux, démontre l'implication du gène *GDI1* dans le retard mental non spécifique.

Fréquence parmi les RMX des mutations dans *Rab-GDI*

Par la suite, dans le but d'estimer la fréquence des mutations dans ce gène parmi les sujets présentant un retard mental non spécifique, des mutations ponctuelles ont été recherchées par DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) chez 164 patients adressés à notre laboratoire (Pr M. Delpech, Hôpital Cochin, Paris, France) pour une recherche de X-fragile. Une nou-

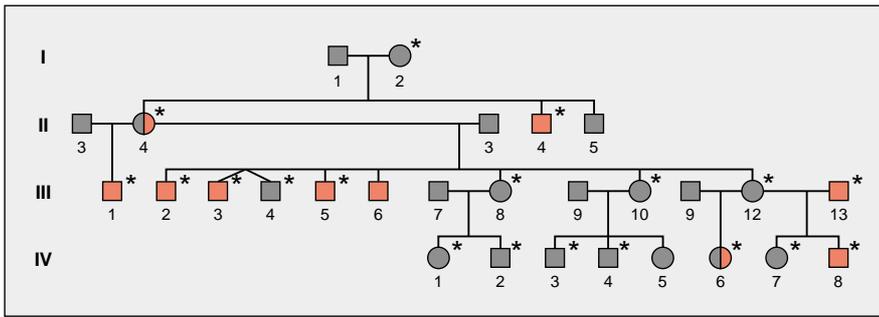


Figure 1. **Arbre généalogique de la famille MRX48.** La co-ségrégation de la mutation R70X (C → T en position 366) avec la maladie a été confirmée par digestion avec l'enzyme DdeI dont un site est créé par cette mutation. Allèle normal: 110 pb + 60 pb; Allèle muté: 90 pb + 60 pb + 20 pb. Les sujets atteints de retard mental sont indiqués en rouge. Les astérisques indiquent les sujets chez lesquels la mutation R70X a été recherchée.

velle mutation faux-sens R423P localisée dans l'exon 11 a été identifiée chez un garçon [8]. Il s'avère que ce garçon appartient à une famille présentant six garçons atteints sur deux générations et des femmes transmettrices atteintes. De façon similaire à la famille précédente MRX48, la transmission se fait sur un mode semi-dominant lié à l'X. Cette mutation, qui entraîne la création d'un site de restriction StyI, n'a pas été retrouvée sur plus de 100 chromosomes X normaux. Cette nouvelle mutation, localisée dans une région conservée de la protéine, confirme ainsi l'implication de ce gène dans cette affection. D'après notre série, la prévalence des mutations dans ce gène peut être estimée entre 0,5 % et 1 % des retards mentaux non spécifiques. Il s'agit, après *FMR2* [9] et plus récemment d'*oligophrénine-1* (*m/s* 1998, n°5, p. 679) [10], du troisième gène en cause dans un retard mental non spécifique.

Fonction de l'oligophrénine-2

Ce gène *GDII*, que nous proposons de dénommer *oligophrénine-2*, est impliqué dans le contrôle du transport vésiculaire et de la biogenèse des vésicules de transport (figure 2). En effet, la protéine Rab-GDI- α est capable de régler l'attachement des protéines Rab à la membrane. Les protéines Rab, comme l'ensemble des petites protéines G, fixent les nucléotides guanyliques GDP et GTP et possèdent une activité GTPasique intrinsèque.

Synthétisées sous la forme de précurseurs cytosolubles, elles sont modifiées par isoprénylation (groupement géranylgeranyle) à leur extrémité carboxy-terminale. Elles s'attachent par la

suite à des compartiments membranaires spécifiques. La protéine Rab liée au GDP est la forme inactive de la molécule. L'interaction avec un facteur d'échange (GEF) provoque la dissociation du GDP et la fixation du GTP. L'activité GTPasique intrinsèque de la protéine, stimulée par des protéines GAP (*GTPase activating protein*), permet le retour à l'état inactif. La protéine Rab-GDI- α est capable de se lier au groupement prénylé de la protéine Rab mûre (notamment RAB3A et RAB3C) dans sa conformation Rab-GDP et, par masquage des groupements hydrophobes, de l'extraire de la membrane. C'est cette liaison à l'unité géranylgeranyle des protéines Rab qui est altérée par la mutation faux-sens L92P de Rab-GDI- α [7]. Cette protéine Rab-GDI- α permet ainsi le recyclage des protéines Rab de la membrane plasmique à la membrane donneuse (vésicule). Le ciblage de la protéine Rab-GDP sur la mem-

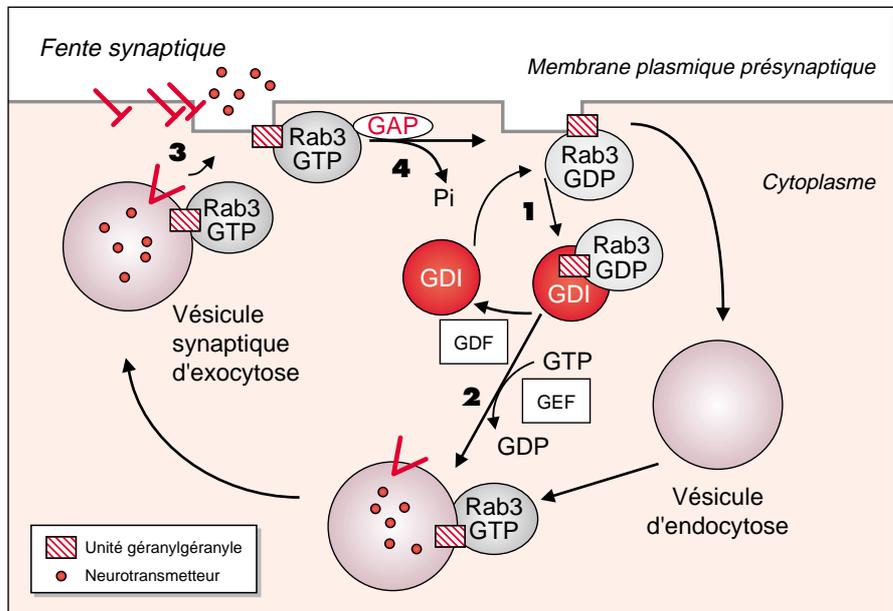


Figure 2. **Modèle de fonctionnement des protéines Rab3 dans les synapses.** 1. Les protéines Rab3 prénylées se complexent avec la protéine Rab-GDI qui les extrait de la membrane plasmique. 2. L'association de la protéine Rab3 à la membrane de la vésicule d'endocytose s'accompagne du relargage de la protéine GDI et le GDP lié à la protéine Rab3 est remplacé par du GTP. 3. La protéine Rab3 liée au GTP, recrutée sur la vésicule synaptique, aurait pour rôle de catalyser l'association d'une protéine vSNARE (V) avec une protéine tSNARE (T) permettant le ciblage de la vésicule vers la membrane plasmique présynaptique. 4. Après la fusion, une protéine GAP stimule l'activité GTPase de la protéine Rab et permet le retour à l'état inactif. GDI : GDP dissociation inhibitor ; GDF : GDI displacement factor ; GEF : GTP exchange factor ; GAP : GTPase activating protein ; SNARE : soluble NFS attachment protein receptor ; V pour vesicle, T pour target.

brane est accompagné du relargage de GDI et les protéines Rab échangent le GDP par du GTP. Il y a intervention d'un facteur GDF (*GDI displacement factor*) et d'un facteur d'échange (GEF). Récemment, un facteur GDF associé à la membrane d'un organite a été identifié. Ce facteur GDF a la propriété de reconnaître Rab-GDI (Rab 5, 7 et 9), de libérer GDI dans le cytoplasme et de lier Rab à la membrane [11]. Chez la levure, une déplétion en GDI a de nombreux effets sur le transport des protéines et entraîne la disparition de la protéine Sec-4 cytosolique.

Le mécanisme que nous proposons pour expliquer le retard mental associé à la perte de fonction de ce gène *GDI1* (*oligophrénine-2*) serait un défaut de régulation du transport des vésicules synaptiques et de la libération des neurotransmetteurs, perturbant la plasticité neuronale et par conséquent les fonctions cognitives (*figure 2*). La protéine Rab-GDI- α pourrait jouer, en outre, un rôle important dans la différenciation neuronale. En effet, des oligonucléotides anti-sens *Gdi1* inhibent la croissance des axones dans les neurones de l'hippocampe de rat [7].

L'identification du gène *oligophrénine-2*, responsable de retard mental non spécifique ouvre ainsi de nombreuses perspectives neurobiologiques. En effet, les différentes protéines de cette voie de signalisation cellulaire

apparaissent comme d'excellent candidats à des altérations des fonctions du système nerveux central ■

Thierry Bienvenu
Vincent Des Portes
Cherif Beldjord
Jamel Chelly

Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

- Des Portes V, Billuart P, Carrié A, Bachner L, Bienvenu T, Vinet MC, Beldjord C, Ponsot G, Kahn A, Boué J, Chelly J. A gene for dominant nonspecific X-linked mental retardation is located in Xq28. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 903-9.
- Gedeon A, Kerr B, Mulley J, Turner G. Localisation of the MRX3 gene for non-specific X linked mental retardation. *J Med Genet* 1991; 28: 372-7.
- Nordstrom AM, Penttinen M, Von Koskull H. Linkage to Xq28 in a family with nonspecific X-linked mental retardation. *Hum Genet* 1992; 90: 263-6.
- Sedlacek Z, Korn B, Konecki DS, Siebenhaar R, Coy JF, Kioschis P, Poustka A. Construction of a transcription map of a 300 kb region around the human G6PD locus by direct cDNA selection. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1865-9.
- Sedlacek Z, Konecki DS, Korn B, Klauck SM, Poustka A. Evolutionary conservation and genomic organization of XAP-4, an Xq28 located gene coding for a human Rab-GDP-dissociation inhibitor (GDI). *Mamm Genome* 1994; 5: 633-9.
- Bachner D, Sedlacek Z, Korn B, Hameister H, Poustka A. Expression patterns of two human genes coding for different Rab-GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 701-8.
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valvorta F, Balch W, Chelly J, Toniolo D. GDI1 is responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 1998; 19: 134-9.
- Bienvenu T, Des Portes V, Saint Martin A, McDonnell N, Billuart P, Carrié A, Vinet MC, Couvert P, Toniolo D, Ropers HH, Moraine C, Van Bokhoven H, Fryns JP, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Non specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. *Hum Mol Genet* 1998; sous presse.
- Gez J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 1996; 13: 105-8.
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, Des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Crollius HR, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 1998; 392: 923-6.
- Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T, Pfeffer SR. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J* 1997; 16: 465-72.

TIRÉS À PART

J. Chelly.

Première Annonce

BRUXELLES

24-26 Septembre 1998

Conférence Internationale

Qualité de vie et Longévité

Les dernières avancées du domaine par les plus grands spécialistes internationaux

Traitements hormonaux - Nutrition

EAQUALL - c/o Dr. Thierry Hertoghe
 European Academy of Quality of Life and Longevity Medicine,
 avenue Albert-Giraud 95, B-1030 Bruxelles, Belgique.

Renseignements :

Yasmine Moors
 Tél. : + 32 2 245 16 90 - Fax : + 32 2 245 42 23
 E-mail : medical.conference@euronet.be