

Expansion de polyglutamines et schizophrénie : une nouvelle protéine acide candidate identifiée chez l'enfant malade

La schizophrénie est une maladie psychiatrique relativement fréquente qui affecte environ 1% de la population générale. Cette maladie est détectée à l'aide de critères de classification internationaux (type DSM-IV ou similaires). L'étiologie de la schizophrénie est inconnue. L'observation de familles, de jumeaux, et d'enfants adoptés a permis de souligner l'importance de facteurs génétiques [1]. D'un point de vue clinique et génétique, la schizophrénie est une maladie hétérogène [2]. L'hypothèse d'une composante génétique multigénique pour cette maladie est fondée sur l'incapacité des modèles monogéniques d'expliquer la « transmission » non mendélienne de la schizophrénie au sein de familles ayant un phénotype de susceptibilité [2]. Dans le même sens, la recherche de locus de susceptibilité pour la schizophrénie (LSS) par analyse de liaison génétique a permis l'identification de plusieurs localisations chromosomiques, dont la plus récente et une des plus significatives en 13q32 [3]. Ces analyses suggèrent aussi qu'un LSS n'influencerait l'étiologie de la schizophrénie que chez une fraction des patients, d'où l'idée qu'un seul LSS ne serait ni nécessaire ni suffisant à la survenue de la maladie, voire qu'un polymorphisme présenté par des individus témoins pourrait y contribuer lorsqu'il se trouverait associé aux variations d'autres gènes dans certaines populations de malades. En complément de la recherche classique de LSS par liaison génétique, d'autres études ont pour but d'identifier des LSS potentiels à l'aide d'une approche « gène candidat ». Il s'agit de rechercher dans le génome des caractéristiques

polymorphiques ou fonctionnelles qui seraient associées à la maladie et de les tester chez les individus atteints. Ainsi, certaines familles au phénotype de susceptibilité semblent présenter un phénomène d'anticipation (apparition plus précoce ou aggravation des premiers symptômes d'une génération à l'autre), d'où l'hypothèse que l'expansion de triplets répétés CAG/CTG de longueur instable (expansion CAG) pourrait être l'un des éléments de la composante génétique de la schizophrénie [4]. Les expansions CAG dans les gènes humains, notamment celles codant pour des expansions de polyglutamines, sont en effet à l'origine de plusieurs maladies neurodégénératives héréditaires qui affectent le cerveau et présentent un phénomène d'anticipation, c'est-à-dire l'apparition des premiers symptômes d'autant plus tôt que la taille de la répétition du triplet CAG à l'origine de la maladie est grande [5]. L'hypothèse d'un lien entre schizophrénie et expansion CAG a été renforcée par la mise en évidence de triplets répétés CAG/CTG de plus grande taille chez certains patients [6]. Cependant, l'éventualité de biais nosologiques pouvant conduire à des artefacts statistiques en matière d'analyse de l'anticipation [7], et la difficulté de répliquer la mise en évidence de triplets répétés de grande taille au sein d'autres populations de malades [8], ont limité la portée de ces résultats. Plus récemment, l'analyse des ADN d'enfants atteints de schizophrénie (*childhood-onset schizophrenia* ou COS) a permis de montrer que la très grande majorité des expansions CAG détectées chez ces malades correspondent en fait à

deux répétitions de triplets CAG qui présentent des allèles stables de très grande longueur dans la population normale: *ERDA1/Dir 1*, un triplet transcrit, ou *CTG18.1*, un triplet intronique dans le gène *SEF2-1* [9]. Ces observations suggèrent que *Dir 1* et *CTG18.1* ne sont pas impliqués dans la maladie, ou qu'ils le seraient avec une faible pénétrance; le cas du très petit nombre de patients présentant une expansion CAG non associée à l'un de ces deux locus restait à préciser. De nombreux triplets répétés CAG/CTG candidats ont par ailleurs été identifiés par criblage de banques d'ADN génomique ou d'ADNc. Bien que l'ensemble de ces gènes candidats n'ait apparemment pas été testé dans toutes les populations de patients, il semble que les gènes les plus intéressants du fait de leur fort degré de polymorphisme ou leur localisation chromosomique dans des régions candidates pour la schizophrénie ne présentent pas d'allèles de taille anormale chez les patients [10].

Cela tendrait-il à suggérer que les triplets répétés CAG/CTG ne sont pas impliqués dans l'étiologie de la schizophrénie ou ne le seraient qu'avec une très faible pénétrance? Il est prématuré de conclure dans la mesure où les études de cet aspect restent partielles. La plupart des études reposent notamment sur l'hypothèse que seules les expansions CAG de grande taille (plus de 40-50 répétitions) seraient impliquées dans la maladie, la mise en évidence d'expansions CAG étant effectuée à l'aide d'une méthode (*repeat expansion detection* ou RED) dont le seuil de détection est de 40-50 répétitions [6]. Par exemple, les échantillons d'ADN de patients choi-

sis pour tester l'expansion de répétitions de triplets dans des gènes candidats ou pour rechercher des protéines candidates à polyglutamines sont souvent ceux qui présentent une grande expansion CAG détectée par la technique RED [10, 11]. Or, l'utilisation préférentielle de ces échantillons ne prend pas en compte la possibilité que des expansions CAG modérées (moins de 40-50 répétitions, voire des variations de quelques répétitions), notamment celles se traduisant par une expansion de polyglutamines, pourraient jouer un rôle dans la schizophrénie. Le parallèle avec les maladies neurodégénératives monogéniques montre que le polymorphisme modéré des polyglutamines peut avoir des conséquences pathologiques (le cas du canal ionique impliqué dans l'ataxie spinocérébelleuse 6 illustre bien cette possibilité [5]). Des phénomènes neurodégénératifs ne semblent pas exister dans la schizophrénie, mais plusieurs groupes de recherche s'accordent à penser que l'apoptose neuronale observée dans les maladies neurodégénératives à polyglutamines est précédée par une phase de déficit fonctionnel. Il semble donc raisonnable de supposer que, en fonction de la nature de la protéine cible, les variants à expansions de polyglutamines pourraient être impliqués dans la schizophrénie en induisant des déficiences non dégénératives. A ce titre, il est intéressant de noter qu'un nouveau gène candidat (codant pour le canal ionique hSKCa3) présente un excès modérément significatif d'allèles de plus grande taille chez certains malades [12]. Une variation supplémentaire de l'approche « candidats » réside dans l'analyse de familles nucléaires présentant un enfant affecté par une forme grave de la maladie comme COS (*childhood onset schizophrenia*). COS est détectée à l'aide des critères classiques de classification internationale, et se manifeste dans la plupart des cas autour de 11-12 ans. Cette forme rare de schizophrénie présente une continuité clinique et neurobiologique avec les formes adultes [13]. Du fait de sa survenue précoce, COS pourrait avoir une composante génétique plus forte, et les phénomènes de continuité avec

les formes adultes suggèrent que l'analyse de COS pourrait permettre de mieux comprendre la susceptibilité génétique à la schizophrénie en général. Cependant, la rareté de COS et le faible nombre de patients font que cette approche n'a pas la valeur informative des analyses de liaison génétique fondées sur un grand nombre de malades, et ne permet donc pas la détection « directe » d'un locus ou d'un gène de susceptibilité. Elle permet simplement la mise en évidence de candidats qui doivent ensuite être testés dans un plus grand nombre et dans une plus grande diversité de malades et d'individus témoins.

En collaboration avec Ellen Sidransky, Edward J. Ginns et Judith Rapoport (NIMH, Bethesda, MD, USA) et Andrzej Galat (DIEP/DEA, Gif/Yvette, France), nous avons testé par *Western blot* 32 lignées lymphoblastoïdes provenant de patients COS non apparentés (origine américaine, ensemble du territoire des USA) à l'aide de 1C2, un anticorps monoclonal dirigé contre la TBP (*TATA-binding protein*). Cet anticorps reconnaît spécifiquement les expansions de polyglutamines de plus de 33-35 glutamines [13], et nous a permis de mettre en évidence une bande de forte intensité d'environ 60 kDa chez deux patientes de race noire (patientes 14 et 18,

Patient	Sexe*	Origine ethnique**	Survenue de la maladie	Prélèvement sanguin	Signal 60 kDa [†]
1	F	Américain, RB	9 ans	14 ans	-
2	F	Américain, RB	11 ans	15 ans	-
3	H	American, RB	10 ans	12 ans	-
4	H	Américain, RB	8 ans	13 ans	-
5	H	Américain, RN	10 ans	14 ans	+
6	H	Américain, RB	10 ans	14 ans	-
7	H	Américain, RB	7 ans	12 ans	-
8	H	Iranien, RB	11 ans	13 ans	-
9	H	Américain, RB	11 ans	17 ans	-
10	F	Américain, RN	10 ans	16 ans	-
11	H	Américain, RB	11 ans	14 ans	-
12	F	Américain, RB	9 ans	10 ans	-
13	H	Américain, RN	11 ans	16 ans	+
14	F	Américain, RN	12 ans	14 ans	++
15	H	Américain, RB	11 ans	15 ans	-
16	F	Américain, RN	12 ans	16 ans	+
17	H	Américain, RB	11 ans	16 ans	-
18	F	Américain, RN	11 ans	13 ans	++
19	F	Américain, RN	12 ans	17 ans	-
20	H	Américain, RB	7 ans	14 ans	-
21	F	Américain, RN	5 ans	9 ans	+
22	H	Américain, RB	6 ans	21 ans	-
23	F	Philippin	11 ans	12 ans	-
24	F	Hispanique, RB	11 ans	16 ans	-
25	F	Américain, RN	10 ans	13 ans	-
26	F	Hispanique, RB	12 ans	14 ans	-
27	F	Hispanique, RB	9 ans	17 ans	-
28	H	Américain, RB	11 ans	12 ans	-
29	H	Américain, RN	12 ans	19 ans	+
30	H	Américain, RN	12 ans	16 ans	+
31	H	Indien	12 ans	15 ans	-
32	H	Américain, RB	12 ans	15 ans	-

32 patients COS ont été testés par analyse western blot avec l'anticorps 1C2. 8/11 patients de race noire montrent un signal positif à 60 kDa (cf. figure 1). *F, femme; H, homme. **RB, race blanche; RN, race noire. †Mr approximatif. -, négatif; +, intensité faible (aussi observée chez des individus témoins de race noire); ++, intensité forte (observée uniquement chez les patients COS).

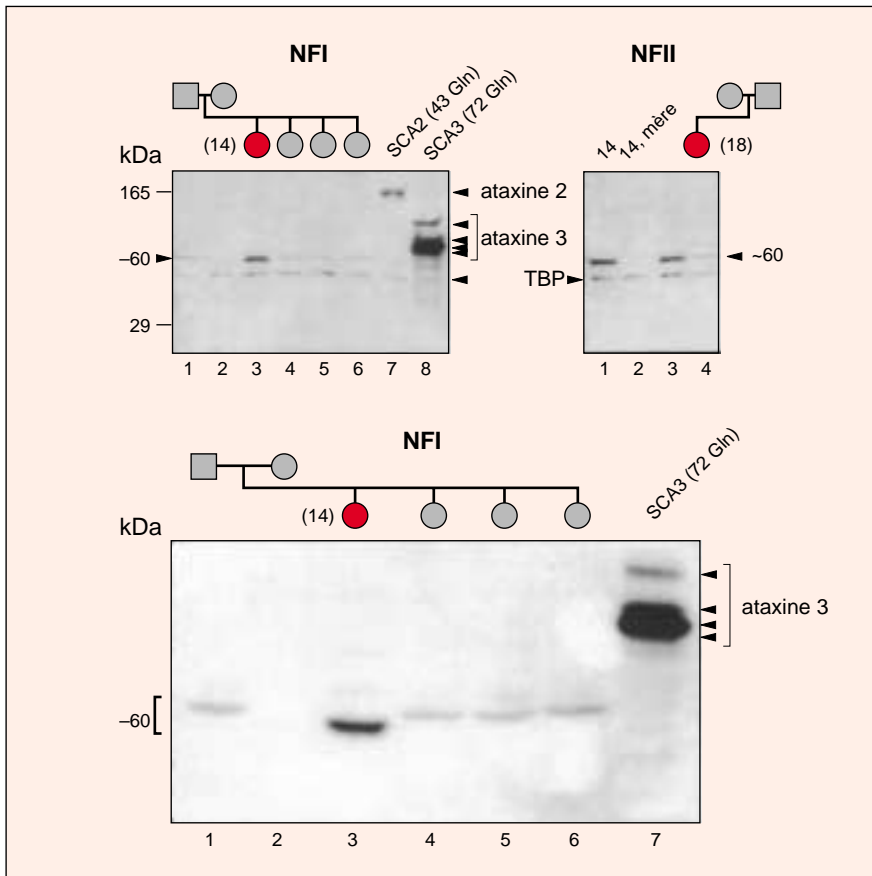


Figure 1. Détection d'une expansion de polyglutamines dans la schizophrénie d'apparition infantile (COS). Les électrophorèses sur extraits protéiques ont été effectuées sur mini-gels de polyacrylamide 4-20% ou sur longs gels de polyacrylamide 10%. Panneau du haut à gauche (famille nucléaire NFI): l'anticorps 1C2 détecte un signal de forte intensité à 60 kDa chez la patiente 14. Le nombre de répétitions glutamines pour TBP dans la famille NFI a été déterminé par analyse PCR et se situe entre 33 et 37 unités. Les témoins positifs montrent les signaux d'expansion de polyglutamines présents chez des patients atteints par SCA2 (ataxine 2, piste 7) ou SCA3 (ataxine 3, piste 8). Panneau du haut à droite (famille nucléaire NFII): la patiente 18 présente aussi un signal de forte intensité. La lignée lymphoblastoïde pour le père n'est pas disponible (père décédé). Les parents ou sœurs des patientes 14 et 18 présentent un signal de faible intensité d'environ 60 kDa, sauf pour la mère de la patiente 14. Panneau du bas au centre: vue agrandie de l'analyse à haute résolution dans la famille NFI. La bande faible migre à une position légèrement plus haute que la bande forte. Les sœurs de la patiente 14 étaient âgées de 13,9 ans (piste 4), 23,3 ans (piste 5), et 23,9 ans (piste 6) au moment du prélèvement sanguin.

familles NFI et NFII, Tableau I et figure 1). Cette bande, indicative d'une nouvelle expansion de polyglutamines, n'apparaît chez aucun des 97 individus témoins comprenant les six individus non affectés dans les familles NFI ou NFII, 38 individus non apparentés de race noire dont onze sont appariés en terme d'âge, et

53 individus de race blanche appartenant à trois familles CEPH-Utah d'origine américaine. Cette bande est aussi absente chez 27 témoins appariés en terme d'âge seulement (enfants d'origine américaine, de race blanche, et présentant une psychose atypique). L'analyse en électrophorèse bi-dimensionnelle (gradient

pI 10-3) nous a permis de préciser le poids moléculaire apparent de cette bande (52-57 kDa; notons que les polyglutamines de grande taille semblent ralentir la migration des protéines) et de montrer qu'il s'agit d'une protéine acide (point isoélectrique apparent compris entre 4 et 5). Cette protéine (GRAP pour *glutamine repeat acidic protein*) ne semble pas être représentée dans la banque de données Genbank. L'absence d'un allèle instable chez la patiente 14 a en effet permis d'exclure les meilleurs candidats présents dans Genbank (une nouvelle protéine acide à polyglutamines de 52,5 kDa [gène *DAN26*], et 20 ADNc humains présentant des triplets répétés CAG polymorphes de plus de 10 répétitions). L'intensité de la bande forte observée chez les patientes 14 et 18 (plus forte que celle de la TBP qui présente en majorité des allèles de 33 à 37 triplets répétés), et l'absence de bruit de fond indiquent clairement qu'il ne s'agit pas d'une réaction croisée de 1C2 avec des protéines cellulaires contenant des polyglutamines de moins de 33-35 glutamines. L'absence de la bande forte chez les individus témoins, notamment chez l'une des sœurs de même âge que la patiente 14, indique par ailleurs qu'il ne s'agit pas de la surexpression d'une protéine au moment de la puberté. Enfin, l'absence de « doubles » bande d'intensité et de taille plus faible que la bande forte chez les patientes 14 et 18 suggèrent que le deuxième allèle de *GRAP* code pour une répétition de moins de 28 glutamines (limite basse de détection de 1C2). Le gène *GRAP* semble donc être un bon candidat pour COS, voire pour la schizophrénie en général [14]. Nous avons détecté une bande d'intensité plus faible que celles de *GRAP* et de *TBP* chez six autres patients. Cette bande est présente chez 16 individus témoins dont les non affectés dans la famille NFI (figure 1), migre sur gel d'électrophorèse à haute résolution à une position légèrement plus haute que la bande forte, et n'est pas détectable par électrophorèse bidimensionnelle sur gradient pI 10-3. Il ne s'agit donc

pas d'un signal correspondant à une longueur plus faible de la polyglutamine dans GRAP, mais vraisemblablement d'une autre protéine qui ne serait pas impliquée dans COS. Afin d'explorer une éventuelle corrélation entre l'expansion de polyglutamines dans GRAP et les profils d'expansion CAG, nous avons comparé les données de *western blot* avec les scores RED et les tailles des triplets *Dir 1* et *CTG18.1*. Les patientes 14 et 18 présentent des scores RED élevés qui diffèrent de 35 CAG et correspondent aux allèles *Dir 1* (*CTG18.1* ayant une longueur normale), d'autres patients COS présentant des scores RED/*Dir 1* élevés mais pas de bande à 60 kDa [9, 14]. La polyglutamine détectée dans GRAP ne semble donc pas être codée par *Dir 1* ou par un triplet répété CAG dont la taille soit dans la zone de détection de RED.

Le faible nombre de patients COS présentant une expansion de polyglutamines n'est pas surprenant. Les hypothèses de multigénicité et d'absence de gène majeur pour la schizophrénie impliquent que relativement peu d'individus présentent un variant donné au sein d'une population restreinte de malades, d'où le risque de ne pas détecter le variant recherché lorsque le nombre de patients accessibles à l'étude est trop faible [15]. Néanmoins, il est intéressant de noter que des expansions de polyglutamines ont aussi été détectées dans des formes adultes de schizophrénie. A l'aide de 1C2, le laboratoire de Guy Rouleau à l'Institut de recherche de l'Hôpital général de Montréal au Canada a mis en évidence une bande immunoréactive surnuméraire d'environ 50 kDa chez 2/59 patients adultes non apparentés d'origine Canadienne et de race blanche; cette bande n'était pas détectée chez 73 individus témoins [16]. Il est bien sûr nécessaire de déterminer s'il s'agit là de GRAP, mais ces observations ainsi que nos résultats suggèrent surtout que les expansions de polyglutamines détectées par 1C2 seraient présentes dans 4% à 5% des cas de schizophrénie, ce qui incite à analyser de façon plus approfondie le statut des variants polyglutamines en matière de suscep-

tibilité génétique à cette maladie [12, 14, 16]. A supposer que GRAP ou d'autres protéines à glutamines soient effectivement impliquées dans la schizophrénie, quel en serait l'intérêt immédiat? En l'absence probable de gène de prédisposition majeur, et la susceptibilité génétique d'un individu dépendant de l'ensemble des variants impliqués et de leurs pénétrances respectives, la détection d'un seul de ces variants chez l'individu n'aurait pas d'intérêt prédictif. L'intérêt immédiat résiderait donc plus probablement dans l'identification d'un nouveau mécanisme impliqué dans la schizophrénie et d'une nouvelle cible thérapeutique. Par ailleurs, et sous réserve d'une pénétrance suffisante, l'étude d'un variant pourrait peut-être permettre de mieux comprendre pourquoi seuls certains patients répondent à un traitement ■

Remerciements

Nous remercions Yvon Trottier et Jean-Louis Mandel (IGBMC, Illkirch) pour l'anticorps 1C2 et leurs discussions constructives, L. Tora et Yves Lutz (IGBMC, Illkirch) pour la préparation des ascites 1C2, Thomas Fernandez (NIMH, Bethesda, MD) pour son aide à la gestion des échantillons, et Alexis Brice (Inserm U. 289, Paris) pour les lignées lymphoblastoïdes provenant de patients atteints par SCA2 ou SCA3.

RÉFÉRENCES

1. Kendler K, Diehl SR. The genetics of schizophrenia: A current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 1993; 19 : 261-85.
2. McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *The Lancet* 1995; 9 : 678-82.
3. Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 et 8p21. *Nat Genet* 1998; 20 : 70-3.
4. Thibault F, Martinez M, Petit M, Jay M, Campion D. Further evidence for anticipation in schizophrenia. *Psychiatry Res* 1995; 59 : 25-33.
5. Koshy BT, Zoghbi HY. The CAG/polyglutamine tract diseases: gene products and molecular pathogenesis. *Brain Pathol* 1997; 7 : 927-42.
6. O'Donovan MC, Guy C, Craddock N, et al. Confirmation of association between expanded CAG/CTG repeats and both schi-

zophrenia and bipolar disorder. *Psychol Med* 1996; 26 : 1145-53.

7. Petronis A, Sherrington RP, Paterson AD, Kennedy JL. Genetic anticipation in schizophrenia: pro and con. *Clin Neurosci* 1995; 3 : 76-80.

8. Laurent C, Zander C, Thibault F, et al. Anticipation in schizophrenia: no evidence of expanded CAG/CTG repeat sequences in French families and sporadic cases. *Am J Med Genet* 1998; 81 : 342-6.

9. Sidransky E, Burgess C, Ikeuchi T, et al. A triplet repeat on 17q accounts for most expansions detected by the repeat expansion detection technique. *Am J Hum Genet* 1998; 62 : 1548-51.

10. Bowen T, Guy C, Speight G, et al. Expansion of 50 CAG/CTG repeats excluded in schizophrenia by application of a highly efficient approach using repeat expansion detection and a PCR screening set. *Am J Hum Genet* 1996; 59 : 912-1.

11. Jones AL, Middle F, Guy C, et al. No evidence for expanded polyglutamine sequences in bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1997; 2 : 478-82.

12. Jacobsen LK, Rapoport JL. Childhood onset schizophrenia: implications of clinical and neurobiological research. *J Child Psychol Psychiatry* 1997; 39 : 101-3.

13. Trottier Y, Lutz Y, Stevanin G, et al. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxia. *Nature* 1995; 378 : 403-6.

14. Morinière S, Saada C, Holbert S, et al. Detection of polyglutamine expansion in a new acidic protein: a candidate for childhood onset schizophrenia? *Mol Psychiatry* 1999; 4 : 58-63.

15. Schurhoff F, Stevanin G, Trottier Y, et al. A preliminary study on early onset schizophrenia and bipolar disorder: large polyglutamine expansions are not involved. *Psychiatry Res* 1997; 72 : 141-4.

16. Joobar R, Benkelfar C, Jannatipour M, et al. Polyglutamine containing proteins in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1999; 4 (sous presse).

TIRÉS A PART

C. Néri.

Stéphanie Morinière
Claudine Saada
Sébastien Holbert
Isabelle Denghein
Christian Néri

Fondation Jean-Dausset CEPH,
27, rue Juliette-Dodu, 75010 Paris, France.