

Les récepteurs du GABA_A et les altérations de leurs réactions aux benzodiazépines

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est considéré comme le principal agent inhibiteur parmi les neurotransmetteurs. Il agit par l'intermédiaire d'un système très complexe de récepteurs. Le récepteur GABA_A est le relais du principal effet du GABA, une augmentation de la conductance au chlore de la membrane neuronale. Il est lui-même formé de sous-unités hétérologues. On connaît une douzaine de sous-unités codées par des gènes différents, et faisant partie de cinq classes (α , β , γ , δ , ρ) qui peuvent se réunir en de multiples combinaisons fonctionnelles, γ compris éventuellement de combinaisons d'une seule classe ou homomériques. Les propriétés biologiques et pharmacologiques des récepteurs dépendent entièrement de la composition en sous-unités. Deux facteurs sont aujourd'hui clairement reconnus : la conjonction de sous-unités α , β , γ est requise pour la potentialisation de la réponse au GABA par les benzodiazépines, le diazépam par exemple. D'autre part, la réponse aux différents analogues des benzodiazépines dépend de la nature de la sous-unité α qui fait partie du récepteur.

L'exemple le plus frappant de cette dépendance est fourni par l'étude du cervelet. Le *Tableau I* montre la composition en sous-unités de différents types cellulaires de cet organe, révélées par la présence de leurs messagers. On voit qu'un type de sous-unités α , dénommée $\alpha 6$, est spécifique des cellules granulaires. Cette sous-unité, analysée en 1990 par un groupe allemand [1], est un polypeptide de 434 acides aminés comportant 60 % d'identité avec les autres sous-unités α , et 30 % avec les autres types. La présence de cette sous-unité confère au récepteur une propriété unique : ces récepteurs, naturels ou recombinants,

Tableau I		
COMPOSITION EN SOUS-UNITÉS DES CELLULES DU CERVELET (D'après [3])		
Cellules en panier (étoilées)	Cellules de Purkinje	Cellules granulaires
$\alpha 1$ ($\alpha 3$)* $\beta 2$ $\gamma 2$	$\alpha 1$ $\beta 2$ $\beta 3$ $\gamma 2$	$\alpha 1$ $\alpha 6$ ($\alpha 4$)* $\beta 2$ $\beta 3$ (βi)* $\gamma 2$ ($\gamma 3$)* δ

* Les messagers faiblement exprimés sont entre parenthèses.

ont une très faible affinité pour les agonistes des benzodiazépines, et une forte affinité pour le Ro 15-4513, ligand des récepteurs qui inhibe l'action du GABA. Les lecteurs de *m/s* se souviennent peut-être qu'en 1986 (voir *m/s* n° 4, vol. 3, p 234) ce produit, fabriqué par Hoffmann La Roche, avait donné des espoirs du fait qu'il supprimait les effets cérébraux de l'alcool, avant d'être mis sur la touche car il ne supprimait pas ses effets toxiques sur le foie et qu'il risquait d'en augmenter la consommation.

Or il existe une lignée de rats non tolérants à l'alcool, dénommée pour cette raison ANT, qui est particulièrement susceptible à l'altération des réflexes de posture par les benzodiazépines. Les cervelets de ces rats ANT ont perdu la possibilité de lier fortement le Ro 15-4513. Or on sait que le déterminant critique pour l'insensibilité du récepteur normal du diazépam est un résidu d'arginine situé en position 100 de la sous-unité $\alpha 6$, alors que les autres sous-unités portent en position 100 une histidine [1]. La même équipe de Heidelberg [2] vient de montrer que la sous-unité $\alpha 6$ des rats ANT porte en cette même posi-

tion 100 une mutation unique de l'Arg en Gln (CGA \rightarrow CAA), responsable des changements d'affinité. Les auteurs se sont assurés qu'il s'agit bien d'une mutation du gène et non d'une « modification éditoriale » (*m/s* n° 10, vol. 7, p. 1098) de l'ARN puisqu'ils l'ont retrouvée sur des clones génomiques. Ils ont ensuite vérifié l'expression dans le cervelet par hybridation *in situ*, et n'ont détecté aucune modification dans les niveaux des messagers. Ils ont aussi fait exprimer les récepteurs ANT et normaux dans des cellules de rein embryonnaire humain, et confirmé dans ces conditions les différences d'affinité pour le Ro 15-4513. Enfin, les récepteurs contenant la sous-unité $\alpha 6$ modifiée donnent naissance à des courants induits par le GABA qui peuvent être potentialisés par le diazépam.

Il reste à relier les observations sur la structure de la sous-unité $\alpha 6$ aux symptômes présentés par les rats ANT. Les auteurs pensent que l'effet anormal des benzodiazépines reflète directement la réponse altérée de leur récepteur contenant la sous-unité $\alpha 6$. Ce serait alors le premier exemple d'une mutation ponctuelle dans une

■■■ BRÈVES ■■■

sous-unité du récepteur GABA_A, capable d'altérer un phénotype. Ce lien est rendu probable par les résultats observés, mais la preuve de la causalité peut encore être discutée. Jusqu'à présent, il n'existe pas de démonstration formelle que la sous-unité $\alpha 6$ fasse partie d'un récepteur fonctionnel. On a en effet détecté dans les cellules en culture jusqu'à 14 messagers différents [3]. Encore plus confuse est la relation entre $\alpha 6$ et la sensibilité à l'alcool. Une mutation de cette sous-unité n'est pas nécessairement en cause, puisque d'autres souches de rats sensibles à l'alcool ne la présentent pas. Dans ce domaine, l'attention se tourne vers la sous-unité $\gamma 2$, et en particulier sur les modalités de sa phosphorylation.

J.C.D.

1. Lüddens H, Pritchett DB, Köhler M, Kilisch I, Keinänen K, Monyer H, Sprengel R, Seeburg PH. Cerebellar GABA_A receptor selective for a behavioural alcohol antagonist. *Nature* 1990 ; 346 : 648-51.
2. Korpi ER, Kleingoort C, Kettenmann H, Seeburg PH. Benzodiazepine-induced motor impairment linked to point mutation in cerebellar GABA_A receptor. *Nature* 1993 ; 361 : 356-9.
3. Farrant M, Cull-Candy S. GABA receptors, granule cells and genes. *Nature* 1993 ; 361 : 302-3.

■■■ Les effets rénaux du monoxyde d'azote (NO). La perfusion intraveineuse d'acides aminés produit, chez l'animal comme chez l'homme, une augmentation du débit plasmatique rénal (DPR), du débit de filtration glomérulaire (DFG), de la diurèse et de la natriurèse. Cernadas *et al.* (Fundacion Jimenez Diaz, Madrid, Espagne) ont comparé chez le rat les effets de la L-arginine, précurseur du NO, à ceux d'autres acides aminés dépourvus de cette propriété. Seule la L-arginine abaisse la pression artérielle, effet inhibé par un analogue, NwNLA, qui bloque la production de NO. Le phénomène est également inhibé par l'atropine suggérant un rôle pour l'acétylcholine endogène. L'effet hypotenseur est potentialisé par l'administration d'un α -bloquant, démontrant la part des catécholamines dans les phénomènes de contre-régulation. Tous les acides aminés testés induisent une diurèse et une natriurèse. La L-arginine et la L-glycine augmentent le DPR et le DFG. Ces derniers effets sont inhibés par la NwNLA, ce qui est attendu pour la L-arginine mais surprenant pour la L-glycine [1]. Dans un travail coopératif, a été examiné le rôle de la NO synthase dans le système de rétrocontrôle tubuloglomérulaire (qui détermine la pression capillaire glomérulaire [Pcg] à l'échelle de chaque néphron). A l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la NO synthase constitutive du cervelet de rat, Wilcox *et al.* [2] ont tout d'abord localisé ce système

enzymatique dans la *macula densa*, c'est-à-dire les cellules du tube distal qui viennent au contact du glomérule et des artérolles afférentes et efférentes pour former l'appareil juxtaglomérulaire qui gouverne le système de rétrocontrôle. La microperfusion d'un inhibiteur de la NO synthase, la L-NMA, dans l'artérolle post-glomérulaire diminue la pression tubulaire de *stop-flow* qui reflète Pcg. La microperfusion tubulaire de L-NMA réduit également Pcg, effet atténué par la L-arginine. A l'inverse, la microperfusion tubulaire de nitroprussiate de sodium qui fournit du NO, augmente Pcg ; la pyocyanine qui inactive le NO exogène, abolit cette action alors que la L-NMA qui inhibe la NO synthase endogène est inefficace. Le furosémide s'oppose à la réabsorption du NaCl à travers les cellules de la *macula densa* ; il bloque ainsi la fonction de cette structure. Le furosémide, co-perfusé avec la L-NMA, supprime les effets de celle-ci sur Pcg. Cela suggère que la NO synthase dans les cellules de la *macula densa* est activée par la réabsorption de NaCl dans le même segment tubulaire. En conclusion, quoique les médiateurs du système de rétrocontrôle restent mal connus, les résultats résumés dans cette brève indiquent que la génération intrarénale de NO pourrait participer à la régulation de ce système.

[1. Cernadas MR, *et al.* *J Pharmacol Exp Ther* 1992 ; 263 : 1023-9.]

[2. Wilcox CS, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 11993-7.]

FLASH

MUTATION DU GÈNE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE CYTOPLASMIQUE DANS LES FORMES FAMILIALES DE SCLÉROSE LATÉRALE AMYOTROPHIQUE

Une découverte d'importance capitale est publiée dans le numéro de *Nature* du 4 mars 1993. Elle concerne une maladie dévastatrice du système nerveux, la sclérose latérale amyotrophique. Celle-ci comporte environ 10 % de formes familiales. Dans 13 familles, des chercheurs, principalement de Boston et de Chicago (MA et IL, USA) ont découvert 11 mutations différentes dans le gène d'une enzyme, la superoxyde dismutase cytoplasmique ou SOD1, localisé sur le bras long du chromosome 21. Cette enzyme fonctionne en détruisant les radicaux superoxydes susceptibles de léser les motoneurones. Cette découverte — dont nous reparlerons plus en détail dans un prochain numéro — oriente les recherches vers l'étude des radicaux libres, et pourrait conduire à une thérapeutique spécifique.

J.C.D.

■■■■ **L'agénésie bilatérale des canaux déférents peut correspondre à une forme fruste de mucoviscidose avec un génotype particulier.** L'absence bilatérale des canaux déférents, responsable d'une stérilité, peut s'observer chez la plupart des sujets mâles atteints de mucoviscidose et aussi, de façon isolée, chez des sujets indemnes de tout autre signe clinique de cette maladie. Les travaux publiés en 1990 par un groupe du CHRU de Lille ont révélé la fréquence de la mutation $\Delta F508$ du gène CF (mutation la plus fréquemment rencontrée dans la mucoviscidose) chez les sujets présentant uniquement une stérilité masculine par absence bilatérale des canaux déférents : dans une population de 17 malades atteints de stérilité masculine vérifiée par scrotomie exploratrice, sept étaient hétérozygotes pour la mutation $\Delta F508$ [1]. Certains sujets avaient déjà souffert de quelques épisodes de sinusite, mais ils étaient tous cliniquement indemnes d'atteinte pulmonaire ou pancréatique. Chez les sujets ayant la mutation $\Delta F508$, le test de la sueur, sur lequel repose le diagnostic de mucoviscidose, montrait une valeur de chlore sudoral un peu inférieure à la limite supérieure de la normale (60 mEq/l) dans un cas, et supérieure à la normale dans les six autres cas. L'observation de la fréquence de la mutation $\Delta F508$ a été confirmée en 1992 par un groupe de Boston qui a identifié 16 malades avec au moins une mutation du gène CF, dans une population de 25 malades [2]. Des travaux publiés récemment par le groupe de Boston [3] et par le groupe lillois associé à un groupe montpelliérain [4] démontrent la présence d'une mutation de l'exon 4, R117H, chez 10 à 20 % des sujets atteints d'agénésie bilatérale des canaux déférents. Cette mutation, qui est l'une de celles considérées comme modérées du point de vue de l'expression clinique de la mucoviscidose [5], était associée, soit à la mutation $\Delta F508$, soit à d'autres mutations plus rares. Les fréquences de la mutation R117H et du génotype $\Delta F508/R117H$ sont nettement supé-

rieures à celles qui sont observées dans les formes classiques de la mucoviscidose. Ces observations confirment qu'une partie des cas d'agénésie bilatérale des canaux déférents correspondent à des formes frustes de mucoviscidose. Elles incitent à rechercher d'autres mutations du gène CF dans les cas d'agénésies où une mutation du gène CF a déjà été identifiée et suggèrent qu'une grande partie des cas d'agénésie bilatérale des canaux déférents pourrait aussi correspondre à de telles formes frustes. Il faut cependant se garder de généraliser et remarquer que, dans la série lilloise qui est maintenant de 23 sujets (dont 12 ont au moins une mutation du gène CF), quatre sujets présentent aussi une agénésie rénale unilatérale et que, chez ces quatre sujets, aucune mutation du gène CF n'a pu jusqu'à présent être identifiée : il se pourrait donc que les formes d'agénésie bilatérale des canaux déférents s'accompagnant d'une agénésie rénale unilatérale représentent une entité pathologique différente de la mucoviscidose. Dans l'immédiat, ces observations incitent à être prudent lorsqu'on envisage une procréation médicalement assistée en prélevant directement des spermatozoïdes au niveau de l'épididyme chez un sujet ayant une agénésie bilatérale des canaux déférents. Le risque d'avoir un enfant porteur d'une forme plus sévère de mucoviscidose est loin d'être négligeable [6]. Dans ce cas, le conseil génétique s'impose et il convient de rechercher des mutations du gène CF chez le sujet et chez sa conjointe. Il conviendra aussi de suivre les sujets ayant une agénésie bilatérale des canaux déférents et un génotype de mucoviscidose, et de rechercher l'apparition éventuelle d'autres manifestations de mucoviscidose, notamment broncho-pulmonaires, afin de déterminer si ces cas correspondent à des formes de mucoviscidose à expression uniquement génitale ou à des formes de mucoviscidose d'évolution lente.

[1. Dumur V, *et al. Lancet* 1990 ; 336 : 512.]

[2. Anguiano A, *et al. J Amer Med Ass* 1992 ; 267 : 1794-7.]

[3. Amos JA, *et al. Pediatr Pulmonol* 1992 ; suppl. n° 8 : 142-3.]

[4. Gervais R, *et al. N Engl J Med* 1993 ; 328 : 446-7.]

[5. Dean M, *et al. Cell* 1990 ; 61 : 863-70.]

[6. Rigot JM, *et al. N Engl J Med* 1991 ; 325 : 64-5.]

■■■■ **Un gène candidat pour la maladie de Friedreich ?** La maladie de Friedreich (FRDA) est une affection autosomique récessive, impliquant le système nerveux central et périphérique. Elle se manifeste par une ataxie progressive, accompagnée en particulier par une cardiomyopathie et un pied creux. Son support anatomique est une dégénérescence des ganglions dorsaux, de la moelle épinière et du cervelet. Le gène FRDA a été localisé en 1988 sur le chromosome 9 en 9q13-21. Il siège à proximité de deux marqueurs, D9S5 et D9S15, délimitant un intervalle de 250 kb, mais des recombinaisons rendaient difficile la localisation exacte. L'équipe strasbourgeoise de J.-L. Mandel et M. Koenig, qui s'est attachée depuis des années à l'élucidation de ce problème, vient d'identifier un transcrit contenant des séquences, conservées au cours de l'évolution, au voisinage de D9S5 [1]. Une banque d'ADNc de cerveau fœtal humain permit d'obtenir un clone appelé X11, capable de s'hybrider avec un marqueur contenant de telles séquences. L'analyse de ce clone aboutit à trouver une phase ouverte de lecture, codant pour un polypeptide de 708 acides aminés. La séquence protéique dérivée ne présentait aucune similitude avec des protéines connues ; elle contenait une suite de 24 résidus semblant représenter un segment transmembranaire. Il semble bien que Duclos *et al.* [1] aient ainsi identifié un gène dans la région du *locus* FRDA. L'organisation de ce gène, qui s'étend sur environ 80 kb, est en cours d'étude. Le transcrit, qui mesure 7 kb, est mis en évi-

dence dans le tissu nerveux, où il est repérable par hybridation *in situ* ; il est absent de certains tissus atteints par la maladie, comme le cœur, mais la cardiomyopathie pourrait être un effet secondaire de la maladie. L'article ne contient pas d'éléments confirmant le rôle du gène en pathologie : des microsatellites identifiés dans la partie 3' de l'ADNc de X11 n'ont pas été informatifs dans les familles examinées. Il faut maintenant s'atteler à la recherche de mutations chez les sujets atteints, ce qui peut être fait dès maintenant sur l'ADNc, mais devra attendre une meilleure connaissance de l'organisation du gène pour l'analyse des séquences flanquantes. C'est alors seulement qu'on saura si un progrès décisif a été accompli. [1. Duclos F, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 109-13.]

■■■ Rôle des chaînes β du récepteur T dans la maturation lymphocytaire. La production de la diversité des anticorps et du réper-

toire lymphocytaire T, est la conséquence de la recombinaison variable entre plusieurs segments d'ADN codant, après réarrangements, pour les immunoglobulines et les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR). Ces réarrangements sont sous le contrôle des gènes RAG1 et RAG2 (*m/s n° 8, vol. 6, p. 820*) dont l'inactivation par recombinaison homologue a pour conséquence un déficit immunitaire combiné [1, 2]. Chez ces animaux, la maturation thymique, qui fait normalement progresser les lymphocytes d'une population double négative CD4⁻CD8⁻ vers, successivement, des cellules double positives CD4⁺CD8⁺ puis simple positive CD4⁺ ou CD8⁺, est bloquée au stade des cellules double négatives. Afin de préciser le rôle de l'expression du TCR sur la maturation thymique, des chercheurs de Boston (MA, USA) et de Saint-Louis (MO, USA) ont introduit chez les souris RAG2 -/- les gènes réarrangés codant, soit pour la chaîne α soit

pour la chaîne β , soit pour les chaînes $\alpha\beta$ du TCR spécifique de l'ovalbumine de poulet [3]. Alors que la présence de la chaîne α ne provoque aucune modification de la maturation thymique, la présence de la chaîne β entraîne l'apparition de la population CD4⁺CD8⁺, prouvant que la sous-unité β du TCR intervient dans la transition entre les stades double négatif et double positif de cette maturation. Enfin, lorsque les deux chaînes sont exprimées, la population simple positive CD4⁺, correspondant au type de restriction du récepteur transgénique, est détectée.

[1. Monbaerts P, *et al. Cell* 1992 68 : 869-77.]
 [2. Shingai Y, *et al. Cell* 1992 ; 68 855-67.]
 [3. Shinkai Y, *et al. Science* 1993 259 : 822-5.]

Erratum :

Nous republions ici la figure 2 (et sa légende), de l'article de N. Le Novère *et al. (m/s n° 1, vol. 9, p. 45)*, qui comportait plusieurs inexactitudes.

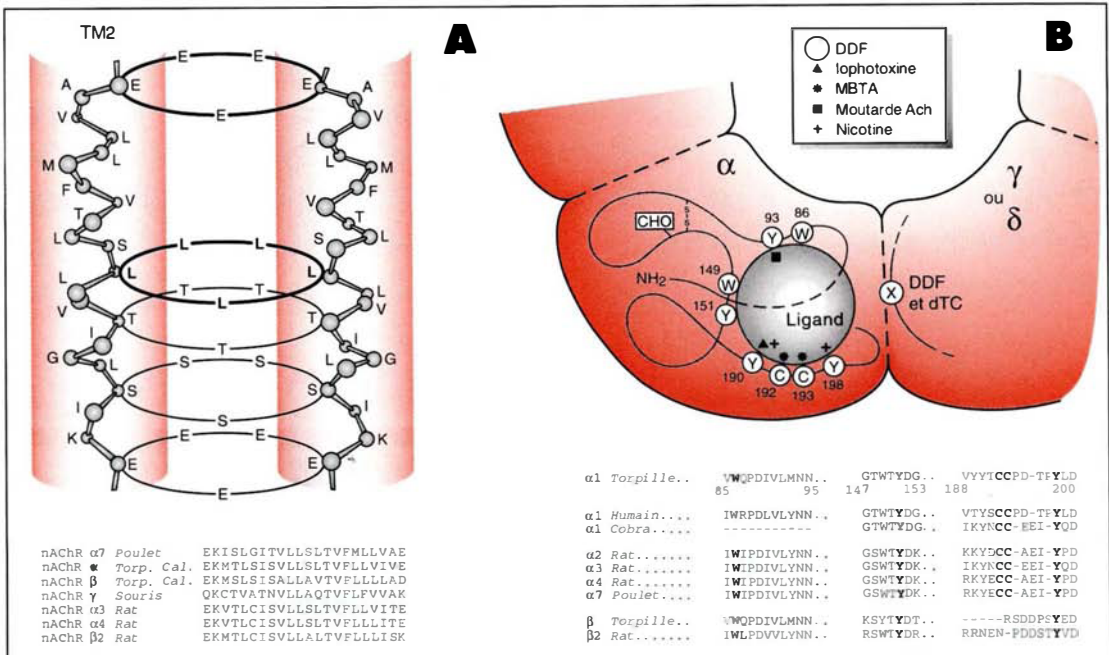


Figure 2. **A. Structure présumptive du pore dans le récepteur $\alpha 7$, entouré par le segment MII de chaque sous-unité. Séquences alignées constituant le segment MII dans différentes sous-unités nicotinniques. Les acides aminés sont présentés à l'aide de leur code à une lettre. B. Modèle à trois boucles du site de fixation des ligands compétitifs dans le récepteur musculaire. Les acides aminés signalés sur le dessin sont marqués par divers ligands compétitifs. Plusieurs des acides aminés essentiels sont conservés dans différentes sous-unités nicotinniques. dTC : d-tubocurarine ; DDF : p(N,N)-diméthylaminobenzène diazonium ; MBTA : 4-(N-maléimino)-benzyltriméthylammonium ; moutarde ACh : acétate de 2-(N-2'-chloroéthyle)-N-méthylam-éthyle. (adapté de [5]).**