



## Le cri humain : une niche acoustique particulière

Luc H. Arnal

Département de Neurosciences, université de Genève, campus Biotech, 9 chemin des mines, 1202 Genève, Suisse. [luc.arnal@unige.ch](mailto:luc.arnal@unige.ch)

> Pourquoi un accord de notes de piano pour paraît-il si agréable alors que d'autres sons, tels que les crissements, sont insupportables et déclenchent des réactions aversives incontrôlables ? Le système auditif humain n'est pas sensible de la même manière à toutes les fréquences du spectre audible. Certains sons semblent induire des réponses émotionnelles stéréotypées, suggérant qu'il existe, au-delà des goûts personnels, des origines neurobiologiques déterminant notre perception et nos réactions au son. Ainsi, tout comme la vision d'une araignée déclenche chez certains des réactions de panique, les hurlements du nouveau-né sont pour nous (parent ou non) difficilement supportables. Alors que nous comprenons de mieux en mieux les mécanismes par lesquels le cerveau réagit aux signaux de danger visuels ou olfactifs [1, 2], les déterminants neurobiologiques de nos réactions émotionnelles aux sons restent toutefois mystérieux. Afin de mieux comprendre ces processus, nous nous sommes intéressés en premier lieu à l'un des signaux de communication acoustiques les plus pertinents pour l'être humain : le cri.

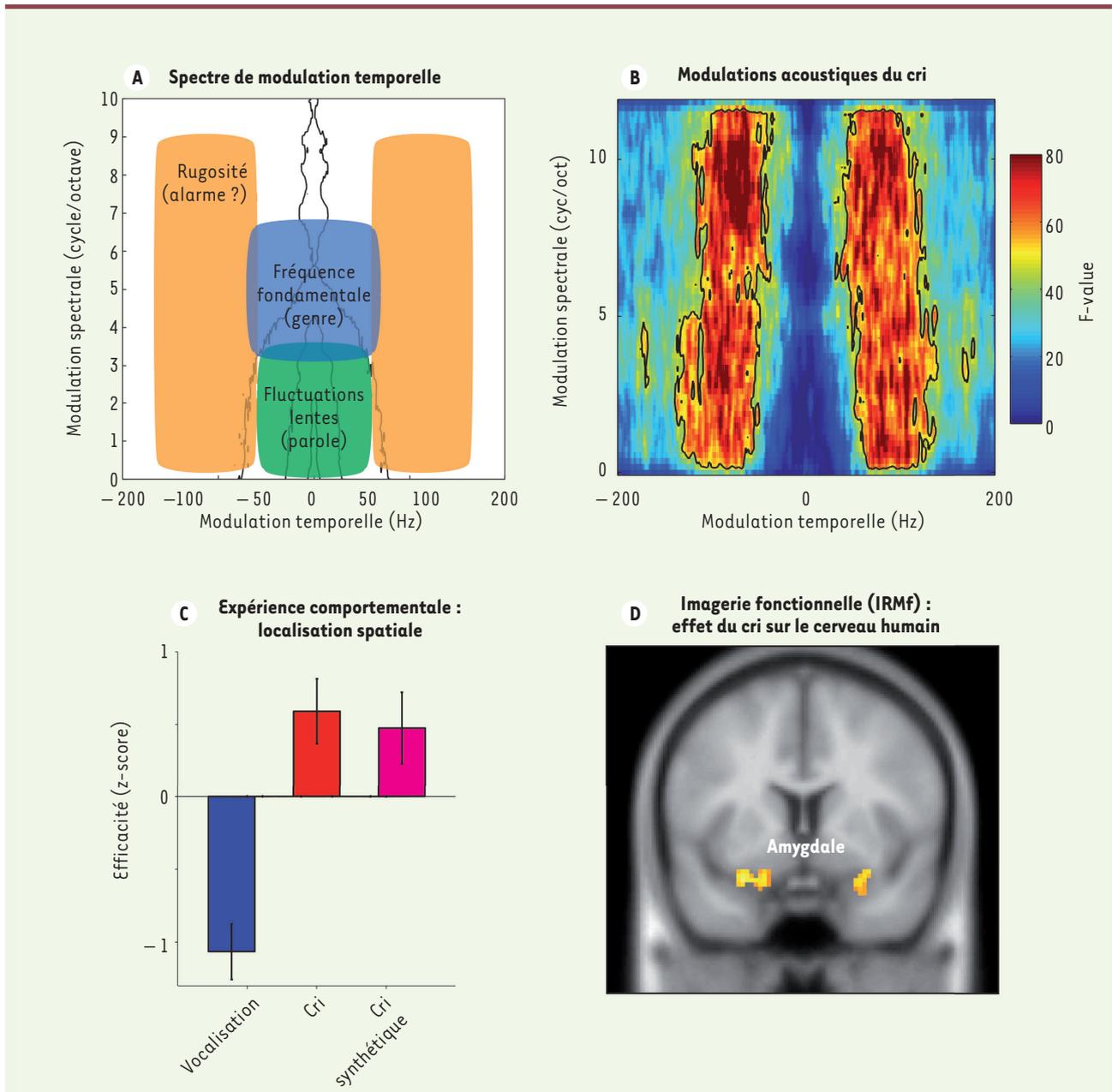
Le signal acoustique est d'une efficacité incomparable pour prévenir rapidement nos congénères d'un danger potentiel. Le son de la voix se propage rapidement dans l'air et peut être perçu sans que l'on ait à se diriger vers la source qui l'émet. Le cri, qui constitue probablement la seule vocalisation innée et partagée par de nombreux mammifères, est donc non seulement utile mais certainement indispensable pour la survie. Compte tenu de leur importance évolutive, il

paraît donc raisonnable de supposer que les signaux auditifs vocaux, comme tout autre trait biologique, ont subi une pression de sélection naturelle déterminant leurs caractéristiques acoustiques. Pour être efficace, un signal sonore doit notamment être adapté aux propriétés de traitement du système auditif du receveur. Selon cette hypothèse, la structure acoustique du cri aurait donc été sculptée selon sa capacité à induire des réactions rapides et efficaces chez l'auditeur.

### Analyse acoustique des modulations temporelles du cri humain

Dans une étude princeps sur le cri humain [3], nous avons cherché à déterminer d'une part si les cris utilisent des caractéristiques acoustiques particulières, et d'autre part comment de tels signaux sont traités par le cerveau humain. Afin d'analyser la structure acoustique du cri, nous avons utilisé une méthode d'analyse du son dénommée spectre de modulation (MPS, pour *modulation power spectrum*). Cette méthode d'analyse, de plus en plus utilisée en neurosciences de l'audition [4], fournit une représentation reflétant la manière dont les neurones auditifs encodent les sons. Cette analyse permet notamment d'identifier la présence (et la fréquence) de modulations d'amplitude dans un signal sonore (Figure 1A). Dans le cas d'une phrase normale par exemple, le MPS permet de révéler la vitesse à laquelle la voix du locuteur est modulée par ses mouvements articulatoires (le rythme syllabique), correspondant à des modulations temporelles entre 4 et 8 Hz. Nous avons

tout d'abord émis l'hypothèse qu'afin d'éviter d'être confondus avec d'autres signaux de communication tels que la parole, les cris humains devaient utiliser un régime fréquentiel particulier. Afin de tester cette hypothèse, nous avons comparé les enregistrements de phrases et de cris produits par 19 adultes consentants. En comparant le MPS des cris et des phrases, nous avons observé que dans les phrases, l'amplitude sonore est préférentiellement modulée en-dessous de 20 Hz, alors que l'amplitude sonore des cris est modulée beaucoup plus rapidement, entre 30 et 150 Hz. Cette gamme de fréquence de modulation, bien connue des psycho-acousticiens, est nommée « rugosité » [5]. Ce régime fréquentiel n'est pas utilisé par les signaux de communication de parole normale et, jusqu'à aujourd'hui, il était considéré comme n'ayant aucune utilité particulière pour la communication vocale. Nos résultats démontrent que, contrairement à cette idée reçue, ce régime est certainement essentiel pour communiquer en cas d'urgence, et constituerait ainsi une niche acoustique privilégiée pour le cri. Des études complémentaires démontrent que ces fréquences rugueuses ne sont pas non plus présentes dans le chant a capella, et que leur absence dans la parole normale se vérifie quel que soit le langage testé. À l'inverse, nous avons découvert que ces fréquences de modulation rapides sont utilisées dans les signaux d'alarme artificiels tels que les klaxons et autres signaux de communication destinés à capter notre attention de façon effi-



**Figure 1. Caractérisation acoustique et neurocomportementale des vocalisations d'alarme chez l'humain.** **A.** Différents types d'informations sont codées dans diverses régions (niches acoustiques) du spectre de modulation temporelle : la fréquence fondamentale (bleu) reflète le genre du locuteur, les fluctuations lentes (vert) encodent les informations langagières plus lentes (syllabiques). La région orange, qui correspond aux sons dits rugueux, n'a jusqu'ici été associée à aucun type de signal de communication. **B.** L'analyse acoustique d'enregistrements de cris produits par 19 humains démontre que ces vocalisations utilisent la rugosité. **C.** Au niveau comportemental, la présence naturelle de rugosité dans le cri permet de localiser ce dernier plus efficacement (plus précisément et plus rapidement) qu'une vocalisation neutre. L'ajout artificiel de rugosité à une vocalisation neutre permet de créer un « cri artificiel » qui favorise de façon équivalente la localisation par rapport à une vocalisation neutre naturelle. **D.** La présence de rugosité dans le signal acoustique induit une augmentation des réponses cérébrales dans l'amygdale, région sous-corticale impliquée dans la réaction au danger.

cace. Il semblerait donc que la rugosité constitue la caractéristique acoustique propre des signaux d'alarmes, qu'ils soient naturels ou artificiels.

### La rugosité acoustique améliore la réaction comportementale

Afin d'observer l'impact des fréquences rugueuses sur le comportement humain,

nous avons demandé à vingt participants de quantifier sur une échelle de 1 à 5 à quel point ces signaux d'alarme (artificiels et naturels) leur paraissent



effrayants. Il apparaît que plus les sons sont rugueux, plus ils sont perçus comme alarmants. De plus, alors que l'ajout artificiel de rugosité augmente cet effet, le fait de filtrer ces fréquences induit l'effet inverse, rendant ces sons moins effrayants. Compte tenu de la saillance perceptive des fréquences rugueuses, nous avons également émis l'hypothèse qu'elles pouvaient conférer un avantage pour localiser une vocalisation dans l'environnement. Nous avons donc cherché à mesurer l'effet de la rugosité sur l'efficacité du traitement d'un son dans l'espace, en comparant l'efficacité de localisation selon le type de vocalisation (cri, voix neutre et cri artificiel). Nous avons ainsi observé que la présence d'indices rugueux dans les cris naturels et artificiels permet la localisation plus rapide et efficace de ces vocalisations par rapport aux vocalisations neutres (Figure 1C).

### Traitement cérébral des stimuli rugueux

Pour mieux comprendre les processus de traitement cérébraux induits par ces sons, nous avons utilisée l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) chez des sujets humains. Nous avons ainsi découvert que les sons rugueux, qu'ils soient musicaux, vocaux ou artificiels, induisent des réponses plus amples dans l'amygdale, une région sous-corticale impliquée dans les réactions au danger (Figure 1D) [6] (→).

En développant une méthode de corrélation inverse, nous avons également cherché à mesurer si les réponses

induites dans les régions cérébrales identifiées sont plus sensibles à certaines parties du spectre de modulation. Nous avons ainsi pu observer que, contrairement à ce qui était présumé dans la littérature, l'amygdale serait spécifiquement sensible à la fenêtre de modulation temporelle correspondant à la rugosité acoustique.

### L'hypothèse des niches acoustiques dans la communication vocale

Ces expériences démontrent que le cri humain et les signaux d'alarme artificiels exploitent une caractéristique acoustique particulière, la rugosité (Figure 1A et B). Les stimuli possédant cette caractéristique sonore permettent de stimuler sélectivement une région cérébrale impliquée dans le traitement du danger (Figure 1D) et accélèrent les réactions comportementales (Figure 1C). L'ensemble de nos résultats soutient donc l'idée que ces modulations rapides de l'amplitude sonore des vocalisations permettent de stimuler efficacement le cerveau de l'auditeur, s'assurant ainsi d'une réponse rapide et inconditionnelle de ce dernier. Ces résultats révèlent un lien direct entre un attribut perceptif (la rugosité) et la réaction comportementale spécifique induite par ce stimulus. Ils démontrent par ailleurs que les cris occupent une niche acoustique privilégiée qui, étant isolée des autres signaux de communication, permet d'assurer l'efficacité biologique et sociale des cris.

Ces observations soutiendraient l'idée selon laquelle les caractéristiques acoustiques utilisées par les humains pour communiquer seraient, comme tout autre trait biologique, contraintes par

leur propension à conférer un avantage évolutif. Selon cette hypothèse, les informations pertinentes (telles que le genre, la distance ou le niveau de panique du locuteur, par exemple) seraient encodées en utilisant des attributs acoustiques particuliers et distincts (respectivement la hauteur, le volume et la rugosité sonore), permettant ainsi de minimiser l'ambiguïté des informations communiquées. Ces « niches acoustiques » auraient ainsi été colonisées séquentiellement par les signaux vocaux en fonction de leur pertinence écologique. Par extension, les signaux de parole se seraient développés dans les régions audibles laissées disponibles par ces signaux primitifs, utilisant des caractéristiques acoustiques plus lentes (< 20 Hz) et permettant de fournir des informations sémantiquement plus riches qu'un simple « Aaaaah ». ♦

### The acoustic niche of screams

#### LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- 1 Phelps EA, LeDoux JE. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 2005 ; 48 : 175-87.
- 2 Rosen JB. The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: a neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2004 ; 3 : 23-41.
- 3 Arnal LH, Flinker A, Kleinschmidt A, et al. Human screams occupy a privileged niche in the communication soundscape. *Curr Biol* 2015 ; 25 : 2051-6.
- 4 Elliott TM, Theunissen FE. The modulation transfer function for speech intelligibility. *PLoS Comput Biol* 2009 ; 5 : e1000302.
- 5 Pressnitzer D. Perception de rugosité psychoacoustique : d'un attribut élémentaire de l'audition à l'écoute musicale. Thèse de doctorat, université Paris 6, 1998.
- 6 Pichon S, Vuilleumier P. Neuro-imagerie et neuroscience des émotions. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 763-70.

(→) Voir la Synthèse de S. Pichon et P. Vuilleumier, *m/s* n° 8-9, août-septembre 2011, page 763

## L'eau de javel et les bactéries

### Une nouvelle arme, cible thérapeutique potentielle

Benjamin Ezraty, Frédéric Barras

Aix-Marseille Université, CNRS, laboratoire de chimie bactérienne, UMR 7283, Institut de microbiologie de la Méditerranée, 31, chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France.

[barras@imm.cnrs.fr](mailto:barras@imm.cnrs.fr)

> L'oxygène, sous sa forme dioxygène ( $O_2$ ), représente 20 % des composants de l'atmosphère. Tous les organismes aérobies l'utilisent pour respirer. Bien que l' $O_2$  soit très stable et possède une faible réactivité, des dérivés (appelés *reactive oxygen species* (ROS) en anglais) peuvent survenir comme produits dérivés du métabolisme. Parmi ces dérivés on trouve notamment l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). Les ROS peuvent être produits par des rayonnements, *via* la radiolyse de l'eau par exemple, ou par des composés chimiques tels que l'eau de javel (HOCl). De par leur réactivité, les ROS peuvent altérer les macromolécules de la vie (ADN, protéines, lipides) et, par conséquent, le fonctionnement des systèmes cellulaires [1] (→).

C'est pourquoi l'ensemble des organismes vivants se sont dotés de systèmes anti-oxydants, incluant des composés chimiques simples (glutathion, ascorbate, etc.) mais aussi des enzymes (catalases, superoxide dismutase, peroxydase, etc.) dont l'action vise à piéger ou éliminer les ROS. Un autre type de protection consiste en la réparation des dommages causés par les ROS [2]. La méthionine (Met), soit en tant qu'acide aminé à l'état libre, soit en tant que résidu d'une chaîne polypeptidique, est une cible privilégiée des ROS qui le convertissent en méthionine sulfoxyde (Met-SO). Les conséquences d'une telle oxydation sont évidemment variables et dépendent du rôle

joué par le(s) résidu(s) Met dans la structure ou l'activité de la protéine ciblée. Plusieurs cas d'inactivation de protéines, soit par déstructuration soit par inhibition de leur activité, ont été rapportés. C'est le cas par exemple de la chaperone<sup>1</sup> bactérienne GroEL<sup>2</sup> (*growth*), de la protéine appelée Ffh (*fifty-four homolog*), impliquée dans la translocation des protéines chez les bactéries, ou encore de la calmoduline, protéine centrale dans la régulation du calcium chez les eucaryotes [3]. Au contraire, on peut observer des cas dans lesquels l'action des ROS est bénéfique : par exemple, dans le cas du régulateur HypT (*hypochlorous transcription*), l'oxydation de résidus Met permet de déclencher une voie de régulation permettant de lutter contre ce toxique [4]. Il existe un troisième cas de figure correspondant à l'exploitation de l'oxydation des résidus pour absorber les ROS et protéger ainsi l'environnement proche de leurs dégâts. La théorie d'une action des Met comme « éponge » contre le stress oxydant a été proposée par Earl Stadtman dans le cas des protéines, postulant que les résidus Met, à l'intérieur d'un polypeptide, protégeraient les résidus voisins [5]. Cette théorie peut également être invoquée pour la Met à l'état libre puisque plusieurs rapports ont fait état du rôle bénéfique de l'ajout de l'acide aminé Met pour l'homéostasie cellulaire [6]. En résumé, l'oxydation des

Met peut être neutre, délétère dans le cas de résidus Met fonctionnellement importants, ou bénéfique dans leur rôle d'éponge anti-ROS.

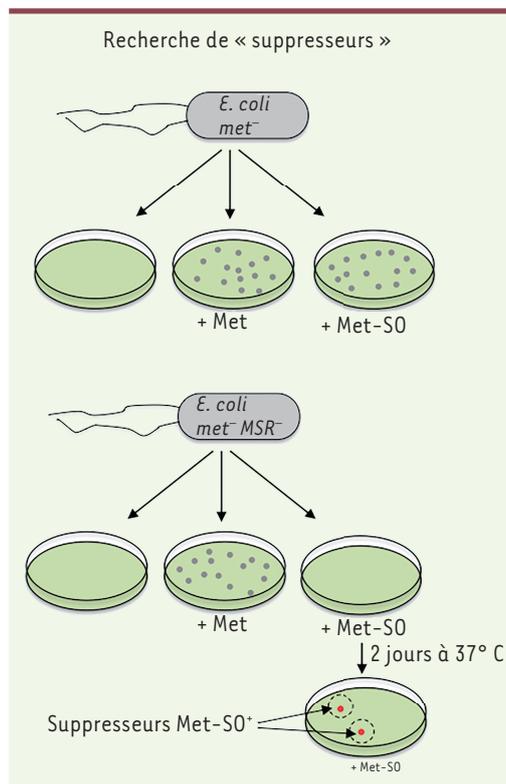
Un niveau de sophistication supplémentaire a émergé au cours de l'évolution : il existe, dans la quasi-totalité des organismes vivants, un système enzymatique qui rend l'oxydation des Met en Met-SO réversible. Ainsi, les dommages potentiels, dûs à la présence de Met-SO délétère, peuvent-ils être prévenus par réduction des Met-SO en Met. De plus, lorsque des Met-SO « éponges » sont formés, leur réduction permet de réinitialiser le processus, en d'autres termes d'essorer l'éponge.

Une première enzyme permettant la réduction des Met-SO, appelée méthionine sulfoxyde réductase (MsrA), a été découverte au début des années 80 [7]. Ce système ne permet cependant qu'une réparation partielle des protéines oxydées. C'est au début des années 2000 que nous avons identifié une deuxième enzyme, MsrB. Nous avons alors montré que l'action conjuguée de MsrA et MsrB était nécessaire pour une réparation totale des protéines oxydées [8]. Le fondement de la coopération entre MsrA et MsrB se trouve dans la chimie de l'oxydation de leurs substrats, Met. Le soufre de la chaîne latérale de Met est un atome asymétrique pouvant s'oxyder sous deux formes (R et S)<sup>3</sup> donnant ainsi deux formes distincts : la Met-S-SO et la Met-R-SO. Or, MsrA et MsrB sont

<sup>1</sup> Une chaperone permet le repliement des protéines.

<sup>2</sup> La mutation *gro* a été isolée dans l'étude du cycle lytique du phage lambda.

<sup>3</sup> Formant ainsi deux diastéréoisomères dénommés R et S (de *Rectus* et *Sinister*, droit et gauche en latin).



**Figure 1. Isolement de suppressors d'*E. coli* capable d'assimiler la Met-SO.** Des souches d'*E. coli* sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture en présence de Met ou Met-SO. La souche *met<sup>-</sup>* (auxotrophe pour la méthionine) pousse dans les deux conditions. La souche *met<sup>-</sup>* et *MSR<sup>-</sup>* (incapable de transformer la Met-SO en Met) ne pousse qu'en présence de Met. Deux jours après incubation à 37°C, des clones capables d'utiliser la Met-SO comme source de Met apparaissent : ce sont les suppressors. Met : méthionine ; Met-SO : méthionine sulfoxyde ; MSR : méthionine sulfoxyde réductase.

La réduction des Met-SO libres en Met par le système MsrAB permet de compenser une éventuelle carence en Met. C'est sur cette propriété que nous avons basé notre sélection génétique. Une souche auxotrophe<sup>5</sup> de *E. coli* ne pouvant pas synthétiser la Met, et ne possédant plus les activités MsrAB, a été ensemencée sur un milieu de croissance contenant un mélange des 2 diastéréoisomères Met-S-SO et Met-R-SO. Quelques jours après incubation à 37°C, quelques rares colonies sont apparues, semblant donc avoir regagné la capacité à utiliser le Met-SO (Figure 1). Par cartographie, nous avons alors localisé la mutation conférant cet avantage sélectif. Il s'agit de l'insertion d'un élément mobile dans un gène régulateur (*yedV*), dont l'inactivation conduit à l'expression d'un opéron<sup>6</sup> (*yedYZ*) situé immédiatement à côté. Bien qu'ils aient été l'objet de plusieurs études biochimiques et structurales, *YedY* et *YedZ* n'avaient, jusqu'alors, aucune fonction physiologique attribuée. Nous avons renommé *YedY* et *YedZ*, respectivement *MsrP* et *MsrQ*.

Le système MsrPQ présente plusieurs différences avec le système MsrAB. Ce système (1) est constitué de protéines à cofacteurs, molybdène<sup>7</sup> dans le cas de *MsrP*, et hème<sup>8</sup> dans le cas de *MsrQ* ; (2) est connecté à la chaîne respiratoire dont il détourne les électrons pour accomplir son cycle catalytique ; (3) a la capacité de réduire efficacement les 2 formes diastéréoisomériques -R-SO et -S-SO ; et enfin (4) est localisé dans le périplasma. Par une approche protéomique, nous avons identifié plus de 20 protéines candidates qui pourraient être sous la surveillance de MsrPQ. En prenant comme modèle *SurA* (*survival*),

chacune dia-stéréo-spécifiques, c'est-à-dire qu'elles ne réduisent efficacement, respectivement, que les formes -S et -R. L'oxydation des résidus Met en -S-SO ou en -R-SO étant *a priori* stochastique, chaque chaîne polypeptidique possèdera autant de chacune des deux formes. Ces études ont conduit au concept de système MsrAB. Il s'agit d'un système ubiquitaire retrouvé des bactéries à l'homme, dont l'importance fonctionnelle a été soulignée tant dans le cadre de l'adaptation des bactéries au stress, de la virulence des bactéries pathogènes, de certaines maladies neuro-dégénératives que dans le vieillissement cellulaire. Le système MsrAB est cytoplasmique chez les bactéries, excepté chez *Neisseria* (bactérie qui regroupe gonocoque et méningocoque). Chez les eucaryotes, plusieurs paralogues<sup>4</sup> existent et des représentants sont trouvés dans différents compartiments : cytoplasme, chloroplaste,

mitochondrie ou lumière du réticulum endoplasmique [9].

Les bactéries sont entourées d'une enveloppe cellulaire dans laquelle, chez les Gram-négatifs, existe un espace inter-membranaire appelé périplasma. L'enveloppe a évidemment un rôle de protection mais elle est aussi un lieu d'échange et de structuration de la cellule. C'est aussi un des sites les plus exposés aux toxiques environnementaux, y compris les ROS produits par les autres habitants du même biotope, hôte infecté ou autres bactéries. Dans ce contexte, il était tout à fait surprenant qu'aucun système MsrAB n'ait été identifié dans ce compartiment dont les protéines sont particulièrement exposées à l'oxydation. C'est en utilisant le modèle *Escherichia coli* et une approche génétique dite de recherche de mutations suppressives « gain de fonction », que nous avons identifié un nouveau système de type Msr ayant des propriétés génétiques et enzymologiques totalement nouvelles et localisé dans le périplasma des bactéries à Gram-négatif [10].

<sup>4</sup> Produits de gènes homologues issus d'un même gène ancestral.

<sup>5</sup> À laquelle il faut fournir un facteur qu'elle ne peut synthétiser, ici Met.

<sup>6</sup> Ensemble de gènes, sous contrôle d'un même promoteur, concourant à la réalisation d'une même fonction.

<sup>7</sup> Élément chimique, de symbole Mo et de numéro atomique 42.

<sup>8</sup> L'hème est un cofacteur formé par une structure aromatique, ou porphyrine, et un atome de métal, permettant de fixer un gaz diatomique. L'hémoglobine, par exemple, contient un hème b permettant de fixer le dioxygène.

une protéine chaperonne dont le rôle est crucial dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire bactérienne, nous avons montré que cette protéine peut être inactivée par oxydation de ses résidus Met, que cela conduit à une hyper-susceptibilité des bactéries à des ROS mais aussi aux radicaux chlorines contenus dans l'eau de javel, et que l'intervention de MsrPQ était nécessaire pour réparer les dommages.

MsrPQ est ainsi un nouveau système de réparation des dommages causés par divers stress radicalaires qui est situé dans l'enveloppe cellulaire bactérienne et qui présente des propriétés totalement différentes du système orthodoxe MsrAB. De fait, une précédente étude réalisée chez la bactérie pathogène *Campylobacter* avait identifié le gène codant le système MsrPQ comme un

facteur de virulence important mais de fonction inconnue [11]. Notre étude a donc clarifié cette fonction inconnue et ce système étant spécifique aux bactéries, fait émerger MsrPQ comme une potentielle nouvelle cible anti-bactérienne. ♦

### How bacteria resist to bleach : a new way of repairing oxidized proteins

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 405-12.
2. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008 ; 77 : 755-6.
3. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2014 ; 1844 : 1367-82.
4. Drazic A, Miura H, Peschek J, et al. Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 9493-8.
5. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 15036-40.
6. Ezraty B, Aussen L, Barras F. Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* 2005 ; 1703 : 221-9.
7. Brot N, Weissbach L, Werth J, Weissbach H. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 2155-8.
8. Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, et al. Repair of oxidized proteins: identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 48915-20.
9. Lee BC, Dikiy A, Kim HY, Gladyshev VN. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1790 : 1471-7.
10. Gennaris A, Ezraty B, Henry C, et al. Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. *Nature* 2015 ; 528 : 409-12.
11. Hitchcock A, Hall SJ, Myers JD, et al. Roles of the twin-arginine translocase and associated chaperones in the biogenesis of the electron transport chains of the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* 2010 ; 156 : 2994-3010.

## NOUVELLE

### Vers un nouveau paradigme en kinésithérapie ?

Bruno Bonnechère<sup>1-3</sup>, Bart Jansen<sup>2,3</sup>, Serge Van Sint Jan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'anatomie, de biomécanique et d'organogénèse (LABO), université libre de Bruxelles, CP 619, route de Lennik 808, 1070 Bruxelles, Belgique ;

<sup>2</sup> Department of electronics and informatics - ETRO, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050 Bruxelles, Belgique ;

<sup>3</sup> iMinds, department of medical information technologies (MIT), Gaston Crommenlaan 8 (box 102), B-9050 Ghent, Belgique.

[bbonnech@ulb.ac.be](mailto:bbonnech@ulb.ac.be)

► L'une des caractéristiques de la kinésithérapie et de la revalidation<sup>1</sup> physique est qu'elle implique une participation active de la part des patients, d'une part lors des séances avec le kinésithérapeute, mais aussi et surtout lors de la réalisation d'exercices qu'ils doivent effectuer à domicile. En effet, pour assurer une bonne évolution clinique, la prescription d'exercices à effectuer à domicile en complément des exercices effectués lors de la thérapie en cabinet est indiquée<sup>2</sup> pour la prise en charge de la grande majorité des pathologies [1]. Ces recommandations sont relativement

bien suivies par les kinésithérapeutes puisqu'on estime que 86 % des patients reçoivent des exercices à effectuer chez eux. Par contre, seulement 48 % des patients effectuent réellement ces exercices, et encore pas totalement puisque le taux moyen d'exercices réellement effectués est de 33 % par rapport à la prescription [2]. Ce faible taux de participation n'est malheureusement pas le seul problème des exercices à domicile. Un autre problème est qu'ils se font sans surveillance. Cette absence de contrôle peut même mener à un effet pervers si les patients n'effectuent pas correctement les mouvements en induisant des postures vicieuses ou des mouvements parasites. Des solutions doivent donc être développées afin

d'augmenter le taux de participation des patients tout en leur permettant un contrôle des exercices afin d'en assurer la bonne réalisation. De manière peut-être quelque peu surprenante, il apparaît que l'utilisation des jeux vidéo dans la revalidation pourrait s'avérer utile pour augmenter la motivation des patients [3]. Une nouvelle tendance, basée sur l'utilisation de jeux vidéo actifs, a émergé il y a quelques années et arrive actuellement à maturité. Les appareils utilisés pour contrôler les jeux, principalement la *Nintendo Wii Balance Board™* et la caméra *Microsoft Kinect™*, pourraient en effet être utilisés comme outil d'évaluation et d'analyse du mouvement pour en contrôler la bonne exécution [4]. Après avoir exposé

<sup>1</sup> Réadaptation.

<sup>2</sup> *Vade-mecum* de kinésithérapie et de rééducation fonctionnelle.



les tenants et aboutissants de l'utilisation de cette nouvelle technologie dans la rééducation, nous discuterons de la place du kinésithérapeute et du médecin de médecine physique et de rééducation dans le traitement.

### L'évolution et la validation de la technologie

Une chose surprenante dans ce domaine est que le matériel utilisé n'a pas été conçu originellement pour la rééducation. Développé dans le cadre des jeux, ces appareils ont ensuite fait l'objet de nombreuses études visant à en valider l'utilisation dans le cadre de certaines applications cliniques. En parallèle, des logiciels ont été développés pour répondre aux besoins et aux exigences du monde clinique. Nous nous limiterons ici à la présentation de la *Kinect™* [5] et de la *Balance Board™* [6], bien que les *smartphones* et autres gyroscopes et accéléromètres puissent également être utilisés pour contrôler les jeux et corriger les mouvements effectués par les patients.

#### La caméra *Kinect™*

Cet appareil est constitué d'un microphone et de deux caméras couplées - une caméra vidéo standard et une caméra infra-rouge utilisée pour détecter les formes et distances des objets. Il s'agit d'un système de capture de mouvement sans nécessité de poser des marqueurs sur le sujet, celui-ci se plaçant devant le capteur et étant détecté automatiquement. L'utilisation de cette caméra a été validée en comparant les résultats obtenus avec ceux de systèmes optoélectroniques (avec marqueurs) utilisés quotidiennement en pratique clinique. Cette validation a visé des mesures anthropométriques, des mesures d'angles (goniométrie) et certains paramètres relatifs à l'analyse de la marche. Concernant l'utilisation des jeux, une étude récente a validé l'utilisation de la *Kinect™* pour effectuer le suivi des patients lorsqu'ils effectuent des exercices de rééducation [5].

#### La *Balance Board™*

La *Balance Board™* est une plateforme de force rectangulaire comprenant aux quatre coins quatre capteurs de force. La combinaison des différents signaux enregistrés par ces capteurs permet d'obtenir le déplacement du centre de pression de la personne se tenant debout sur la plateforme. De nombreuses études ont été effectuées pour valider cet appareil en comparant les résultats obtenus avec ceux obtenus avec une plateforme de force standard. L'équilibre statique ainsi que dynamique peuvent être testés avec des sujets sains mais aussi chez des patients (par exemple des patients atteints de la maladie de Parkinson, des patients lombalgiques, ou des cas de rééducation après reconstruction des ligaments croisés). Une étude vient de valider l'utilisation de cette plateforme de force pour l'enregistrement du centre de pression et de différents paramètres cliniques qui en dérivent lors de la réalisation d'exercices de rééducation contrôlés par la *Balance Board™* [6].

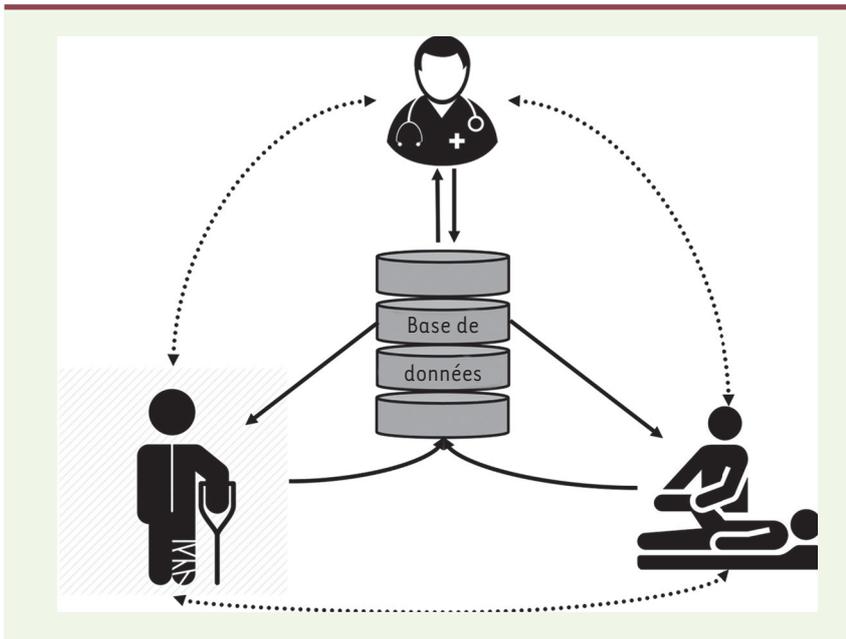
#### Quelles sont les implications pratiques ?

Nous avons vu que les appareils utilisés fournissaient, dans une certaine limite bien entendu, des résultats satisfaisants et similaires aux *gold-standards* utilisés en clinique. Cela offre donc de nouvelles perspectives pour la rééducation. L'avantage majeur est que ces appareils, couplés à des logiciels proposant des exercices de rééducation, fournissent un *feedback*. Celui-ci peut se faire en temps réel pour corriger les mouvements du patient et augmenter la proprioception (c'est-à-dire la manière dont le patient perçoit le corps dans l'espace) ou après la réalisation de l'exercice (ou de la session d'exercices) pour avoir un aperçu global ainsi qu'une vision de l'évolution temporelle. Mais ces informations peuvent, et doivent, également être utilisées par le clinicien en charge du patient. Ces mesures

permettent en effet un suivi quantifié et objectif de l'évolution des patients. Il s'agit donc de données précieuses pour adapter le traitement (comme les types d'exercices, leur durée, leur intensité, etc.) en fonction des capacités actuelles du patient et ainsi maximiser les bénéfices de l'intervention. Force est de reconnaître que pour diverses raisons (manque de temps, manque de moyen technologique, absence de formation adéquate, etc.), l'évaluation fonctionnelle quantifiée des patients est trop souvent négligée en kinésithérapie.

Les systèmes d'analyse du mouvement couplés aux exercices de rééducation offrent donc de nouvelles possibilités pour les cliniciens : un suivi régulier des patients, une évaluation quantifiée automatisée et donc totalement objective, des mesures effectuées dans l'environnement naturel du patient (ce qui contraste grandement avec les analyses du mouvement classiques effectuées dans des couloirs de marche, le patient étant en sous-vêtements avec des marqueurs collés sur le corps), le tout pour un coût bien moindre (à peine plus de 100 € sont nécessaires pour l'un ou l'autre de ces appareils, auquel il faut tout de même ajouter le prix des logiciels de capture et d'analyse des résultats, ce prix étant variable selon le concepteur).

Ces nouvelles perspectives impliquent également de nouvelles responsabilités pour les professionnels de santé impliqués dans la prise en charge de ces patients. Quelles sont les nouvelles responsabilités impliquées par ces nouveaux systèmes ? La *Figure 1* schématise les différents acteurs de la rééducation. Les bases de données, couplées à un mécanisme de création de scores et de rapports d'évaluation fonctionnelle, occupent une place primordiale au centre du processus de l'échange d'information entre les acteurs concernés. Cela va, et doit, mener à des changements au niveau de la prise en charge des patients.



**Figure 1. La communication entre les différents acteurs de la réhabilitation.** Les lignes pointillées représentent les moyens de communication classiques et conventionnels et les lignes continues ceux utilisés par la (télé)réhabilitation. On observe la position centrale de la base de données et des outils d'analyse de ces données (d'après [8]).

### Un nouveau rôle pour les cliniciens ?

Le processus de réhabilitation pouvant être long, la quantité de données récoltées durant les exercices effectués tout au long de ce traitement devient rapidement importante. De plus, des données provenant de l'examen clinique et des examens complémentaires peuvent également s'ajouter au dossier [7] (→). La prise en compte de l'ensemble de ces données hétérogènes requiert donc du clinicien une expérience importante afin de traiter son patient au mieux. Dans ce contexte, l'apport des nouvelles technologies, notamment avec les techniques de *data mining*<sup>3</sup>, est crucial. Ces techniques permettent d'analyser un grand nombre de données et de variables afin d'en retirer les informations les plus pertinentes.

(→) Voir la Synthèse de S. Van Sint Jan et al., *m/s* n° 5, mai 2013, page 529

<sup>3</sup> Techniques d'extraction des connaissances.

Les cliniciens doivent-ils donc s'inquiéter d'être relégués au second plan suite à l'essor de la technologie ? Heureusement non ! Tout aussi perfectionné que soit un système d'analyse de données, il est toujours tributaire de la qualité des entrées qu'il reçoit. Or la majorité des systèmes technologiques vise à quantifier le mouvement, alors qu'une part importante de la kinésithérapie consiste à juger et améliorer la qualité du geste. L'examen clinique rigoureux, alliant palpation et mobilisation, est toujours indispensable à la bonne prise en charge du patient. Un dernier point à aborder, et non des moindres, est de déterminer dans quelle mesure ces systèmes sont capables de travailler seuls. Nous avons vu que s'il était impossible pour l'être humain de traiter et d'analyser toutes les données collectées, c'est aisément possible pour des ordinateurs. Mais est-il réellement responsable de confier la responsabilité de la configuration des exercices de réhabilitation à des machines sans assurer aucun contrôle ? Certainement pas :

les machines ne nous contrôlent pas (encore). Faut-il négliger totalement la technologie sous prétexte que la kinésithérapie est une profession manuelle basée sur le ressenti du clinicien ? Certainement pas non plus. Le dernier mot restera au clinicien qui se basera sur sa propre expérience clinique et sur les nouvelles informations obtenues pour guider au mieux son patient.

En conclusion, dans le futur le clinicien sera amené à travailler de pair avec la technologie pour assurer un suivi du patient, ce qui permettra une adaptation continue du traitement aux besoins des patients. Tout le challenge consistera donc à trouver le bon équilibre entre utilisation et acceptation de la technologie et relation humaine centrée sur le patient. ♦

### Towards a new paradigm in physiotherapy ?

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- Jordan JL, Holden MA, Mason EE, Foster NE. Interventions to improve adherence to exercise for chronic musculoskeletal pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 ; 1 : CD005956.
- Bonnechère B, Jansen B, Omelina L, Van Sint Jan S. Do patients perform their exercises at home and why (not)? A survey on patients' habits during rehabilitation exercises. *Ultras Med J* 2016 ; 2 : 41-6.
- Tatla SK, Sauve K, Virji-Babul N, et al. Evidence for outcomes of motivational rehabilitation interventions for children and adolescents with cerebral palsy: an American Academy for Cerebral Palsy and Developmental Medicine systematic review. *Dev Med Child Neurol* 2013 ; 55 : 593-601.
- Bower KJ, Louie J, Landesrocha Y, et al. Clinical feasibility of interactive motion-controlled games for stroke rehabilitation. *J Neuroeng Rehabil* 2015 ; 12 : 63.
- van Diest M, Stegenga J, Wörtche HJ, et al. Suitability of Kinect for measuring whole body movement patterns during exergaming. *J Biomech* 2014 ; 47 : 2925-32.
- Bonnechère B, Jansen B, Omelina L, et al. Validation of the Balance Board™ for clinical evaluation of balance during serious gaming rehabilitation exercises. *Telemed JE Health* 2016 ; sous presse.
- Van Sint Jan S, Wermenbol V, Van Bogaert P, et al. Une plate-forme technologique liée à la paralysie cérébrale : le projet ICT4Rehab. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 529-36.
- Bonnechère B. *Les jeux vidéo au service des patients ? L'utilisation des serious games en réhabilitation.* Sarrebrücken : Éditions Universitaires Européennes, 2015 : 252 p.



## Caractérisation du circuit impliqué dans les démangeaisons mécaniques au niveau de la moelle épinière

Steeve Bourane

Molecular Neurobiology Laboratory,  
The Salk Institute for Biological Studies,  
10010 North Torrey Pines Road, La Jolla,  
CA 92037, États-Unis.  
[jbourane@salk.edu](mailto:jbourane@salk.edu)

► Les informations sensorielles telles que la douleur, la température, le toucher et les démangeaisons sont initialement détectées au niveau de la peau, des muscles et/ou des organes internes par les neurones périphériques des ganglions rachidiens dorsaux<sup>1</sup>. Elles sont transmises à la moelle épinière où elles sont traitées par des réseaux neuronaux complexes. Dans la corne dorsale de la moelle épinière<sup>1</sup>, il existe un grand nombre d'interneurones distincts, excitateurs ou inhibiteurs, qui intègrent et modulent l'information sensorielle avant sa transmission au cerveau. Les changements pathologiques affectant ces réseaux neuronaux peuvent notamment conduire à des douleurs et démangeaisons chroniques qui sont à la base de problèmes cliniques majeurs pour lesquels peu de thérapies efficaces sont disponibles. L'étude et la caractérisation de ces réseaux spinaux<sup>2</sup> représentent donc une nécessité pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### Diversité neuronale au sein de la corne dorsale de la moelle épinière

La corne dorsale de la moelle épinière contient une multitude de types neuronaux distincts organisés en couches ou *laminae*. Au cours du développement

embryonnaire, huit groupes de progéniteurs neuronaux, produisant huit types d'interneurones dorsaux différents, ont pu être identifiés par l'expression combinatoire de facteurs de transcription. Les populations neuronales ainsi formées sont nommées dl (*dorsal interneuron*) : dl1 à dl6, dl<sub>A</sub> et dl<sub>B</sub>. Ces neurones sont classiquement divisés en 2 groupes selon l'expression post-mitotique du facteur de transcription Lbx1 (*Ladybird homeobox 1*) : les dl1 à 3 sont Lbx1-négatifs (-) ; les dl4 à 6, dl<sub>A</sub> et dl<sub>B</sub> sont Lbx1-positifs (+) [1, 2]. Une fois générés, les neurones des groupes dl1 à 3 et dl6 migreront ventralement pour former les couches profondes de la moelle épinière alors que les neurones des groupes dl4, dl5, dl<sub>A</sub> et dl<sub>B</sub> vont migrer dorsalement pour former les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 1A). Les neurones Lbx1+ des couches superficielles peuvent de plus être subdivisés en deux sous-groupes grâce à l'expression différentielle de facteurs de transcription et la nature excitatrice ou inhibitrice de leur neurotransmetteur. Ainsi les neurones dl4 et dl<sub>A</sub>, qui expriment le facteur de transcription Pax2 (*paired box 2*), produisent les différents sous-types de neurones inhibiteurs, alors que les neurones dl5 et dl<sub>B</sub>, exprimant les facteurs de transcription Lmx1b (*LIM homeobox transcription factor 1-beta*) et Tlx3 (*T-cell leukemia homeobox 3*), donnent naissance aux différents sous-types de neurones excitateurs de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 1B). Au cours des dernières années, diverses approches expérimentales, comme des

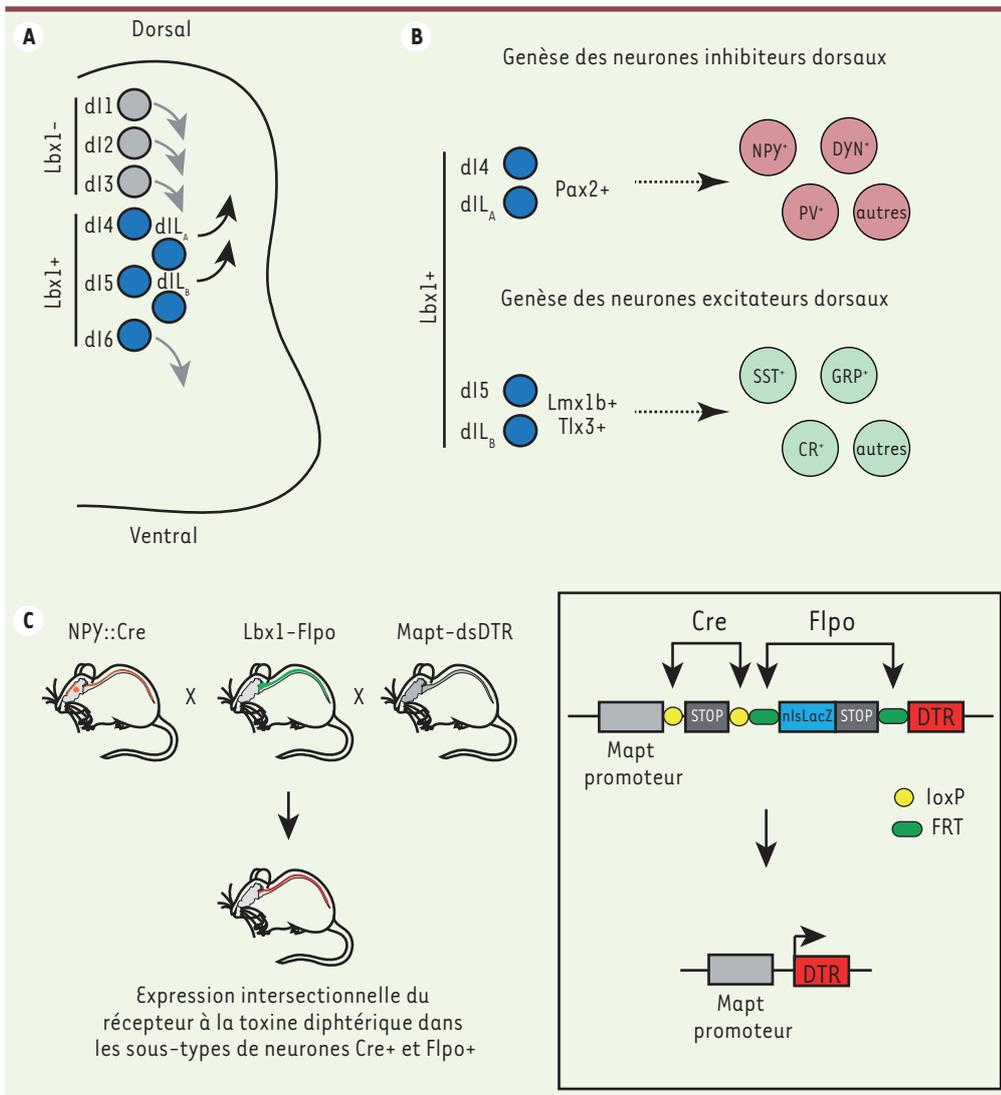
analyses morphologiques, électrophysiologiques et immunohistochimiques, ont été utilisées afin de caractériser ces différents sous-types d'interneurones dorsaux. Cependant, aucune classification claire n'a pu se dégager afin d'établir leur rôle fonctionnel. Néanmoins, plusieurs populations ont pu être identifiées chez l'adulte sur la base de l'expression de neuropeptides et de diverses protéines. Ainsi certains neuropeptides (comme la somatostatine, la substance P ou la neurotensine) ou protéines fixant le calcium (la calbindine et la calrétinine) ont été identifiés dans des sous-types d'interneurones excitateurs alors que d'autres (le neuropeptide Y [NPY], la galanine, la parvalbumine) sont majoritairement exprimés dans des sous-types de neurones inhibiteurs [3, 4] (Figure 1B).

### La génétique intersectionnelle pour l'étude fonctionnelle des sous-populations d'interneurones de la corne dorsale de la moelle épinière

Ces différentes classes d'interneurones dorsaux représentent-elles des populations fonctionnelles distinctes ? Sont-elles impliquées dans la formation de circuits spinaux spécifiquement impliqués dans la douleur, le toucher, les démangeaisons ? Répondre formellement à ces questions resta longtemps un véritable challenge du fait de cette diversité neuronale et du manque d'outils génétiques permettant, d'une part, d'analyser les propriétés propres à chacune de ces sous-populations et,

<sup>1</sup> Au niveau de chaque segment de la moelle épinière naît une paire de nerfs spinaux, possédant une racine dorsale sensitive et une racine ventrale motrice. Les neurones sensitifs, dont l'extrémité sensitive se trouve au niveau de la peau par exemple, véhiculent l'information jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière. Leurs corps cellulaires sont regroupés en un ganglion, situé en dehors de la moelle, au niveau de la racine dorsale du nerf, appelé ganglion rachidien dorsal.

<sup>2</sup> De la moelle épinière.



**Figure 1. Établissement de la diversité neuronale au sein de la corne dorsale de la moelle épinière et utilisation d'une approche de génétique intersectionnelle pour son étude.** **A.** Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont générés à partir de huit groupes distincts d'interneurones au cours du développement embryonnaire : d11 à d16, dILA et dILB. L'expression post-mitotique du facteur de transcription Lbx1 permet de les diviser en deux groupes : a) Lbx1-négatif : d11 à d13 et b) Lbx1-positif : d14 à d16, dILA et dILB. Les neurones des groupes d11 à d13 et d16 migreront ventralement pour former les couches profondes de la moelle épinière alors que les neurones des groupes d14, d15, dILA et dILB formeront les couches superficielles. **B.** Les neurones post-mitotiques exprimant Lbx1 formant les couches superficielles peuvent être ensuite divisés

en deux sous-groupes distincts : les neurones inhibiteurs exprimant le facteur de transcription Pax2 (d14 et dILA) et les neurones excitateurs exprimant les facteurs de transcription Lmx1b et Tlx3 (d15 et dILB). L'expression de neuropeptides, de protéines liant le calcium et d'autres marqueurs permettent de diviser ces deux groupes en plusieurs sous-types au stade adulte. **C.** Le croisement entre des souris génétiquement modifiées exprimant (i) la Cre recombinase sous le contrôle du gène NPY, (ii) la Flpo recombinase sous le contrôle du gène Lbx1 et (iii) le récepteur à la toxine diphtérique précédé de deux cassettes STOP (dépendantes de la Cre et la Flpo, Mapt-dsDTR) permet de restreindre l'expression du récepteur aux sous-types de neurones inhibiteurs de la corne dorsale de la moelle épinière exprimant à la fois la NPY::Cre et la Lbx1-Flpo. Le système de recombinaison Flp-FRT est équivalent au système Cre-lox, la recombinase Flpo, issue de la levure, ciblant les séquences FRT. dl : *dorsal interneuron* ; Lbx1 : *Ladybird homeobox 1* ; Pax2 : *paired box 2* ; Lmx1b : *LIM homeobox transcription factor 1-beta* ; Tlx3 : *T-cell leukemia homeobox 3* ; NPY : *neuropeptide Y* ; DYN : *dynorphine* ; PV : *parvalbumine* ; SST : *somatostatine* ; GRP : *gastrin releasing peptide* ; CR : *calrétinine* ; DTR : *diphtheria toxin receptor* ; Mapt : *microtubule-associated protein tau* ; FRT : *flippase recognition target* ; nlsLacZ : *nuclear location signal β-galactosidase*.

d'autre part, de disséquer les circuits entremêlés au sein de la corne dorsale de la moelle épinière. Grâce aux connaissances acquises sur le développement embryonnaire combinées à l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires, nous avons développé une stratégie dite de « génétique

intersectionnelle<sup>3</sup> » (Figure 1C) qui permet de manipuler génétiquement la plupart de ces interneurones. Il est en

<sup>3</sup> L'intersection de l'expression de différents gènes dans une même population cellulaire permet grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées exprimant différentes recombinases sous le contrôle de ces gènes de les cibler spécifiquement.

effet maintenant possible de spécifiquement les visualiser, les éliminer, les activer, les rendre « fonctionnellement silencieux » ou encore de déterminer leur connectivité. L'utilisation de ce type d'approche a permis récemment d'identifier, au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, un circuit



neuronal spécifiquement impliqué dans le contrôle des démangeaisons induites par des stimuli mécaniques légers, non douloureux [5].

### Les interneurons exprimant le neuropeptide NPY

Afin de caractériser les fonctions des interneurons Lbx1+/NPY+ des couches superficielles de la moelle épinière, nous avons utilisé des animaux transgéniques qui expriment la Cre recombinase<sup>4</sup> sous le contrôle du promoteur du gène NPY (NPY::Cre). En les croisant avec une souris reportrice, nous avons observé que les neurones Cre+ sont majoritairement localisés dans les couches III/IV de la corne dorsale de la moelle épinière, et confirmé qu'ils sont principalement de type inhibiteur. Nous les avons ensuite sélectivement ciblés en y exprimant le récepteur pour la toxine diphtérique, puis spécifiquement éliminés au stade adulte en injectant la toxine aux souris. De manière frappante, deux semaines après l'ablation des neurones NPY::Cre+ au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, les souris développent des démangeaisons chroniques, avec comme conséquence visible, l'apparition de plaies au niveau de leur pelage.

Il existe deux grands types de démangeaisons : celles induites par des stimuli mécaniques légers (comme la présence de fibres de laine d'un pullover ou le déplacement d'un insecte sur notre peau) et celles induites chimiquement (suite à une piqûre de moustique ou lors de réactions allergiques). Chez les animaux dépourvus d'interneurons NPY+ soumis, avant l'apparition de leur symptômes, soit à une stimulation chimique (injection d'agents chimiques irritants dans la peau) soit à une stimulation mécanique (utilisation d'une sonde mécanique délivrant une stimu-

lation tactile au niveau du pelage), une nette augmentation de la fréquence des démangeaisons, chez les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles, n'est observée que dans le second cas, suggérant que la population d'interneurons NPY+ est impliquée dans un circuit neuronal contrôlant spécifiquement les démangeaisons mécaniques. Ces résultats ont été confirmés en utilisant une autre stratégie permettant, non pas d'éliminer les neurones NPY::Cre+, mais de les rendre transitoirement « fonctionnellement silencieux ». Les souris dépourvues d'interneurons NPY::Cre+ ne présentent pas de défaut majeur dans leur réponse aux stimuli douloureux, qu'ils soient d'origine mécanique, chimique ou thermique. Il existe donc des circuits spécifiques au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, les interneurons NPY+ participant au circuit contrôlant les démangeaisons mécaniques mais pas à celui contrôlant les douleurs mécaniques, qui est, lui, constitué d'interneurons dorsaux exprimant le peptide opioïde dynorphine [6].

### Différents circuits spinaux sont impliqués pour les démangeaisons chimiques et mécaniques

Afin de déterminer si, plus généralement, le circuit spinal contrôlant les démangeaisons mécaniques utilisait les mêmes voies neuronales que celles intervenant dans le contrôle des démangeaisons chimiques, les souris dépourvues de neurones NPY::Cre+ ont été traitées avec des agents antihistaminiques qui apaisent les démangeaisons chimiques. Dans ce cas, aucune diminution significative de la fréquence des démangeaisons induites mécaniquement n'est observée. Le circuit des démangeaisons mécaniques ne dépend donc pas des histamines, conformément à ce qui avait été suggéré chez l'homme [7]. Une population d'interneurons dorsaux exprimant GRPR, le récepteur au GRP (*gastrin-releasing peptide*), a récemment été identifiée comme intervenant

dans le contrôle spinal des démangeaisons chimiques [8-10] (→).

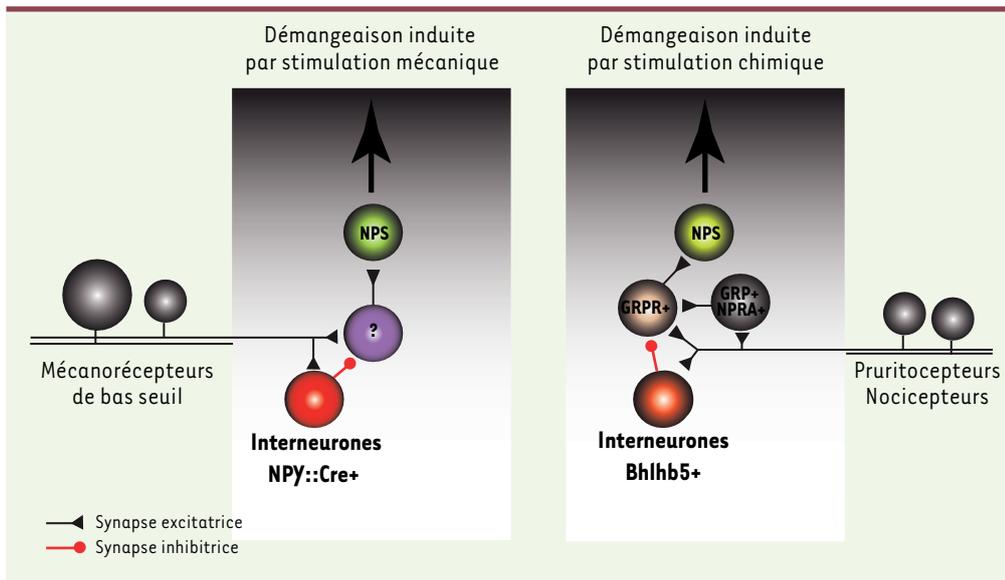
En utilisant un antagoniste de GRPR, ou en éliminant les interneurons GRPR+ chez nos animaux dépourvus de neurones NPY+, aucune diminution des démangeaisons induites mécaniquement n'a été observée. L'ensemble de ces données indique donc que les informations sensorielles activant les circuits neuronaux impliquant les interneurons NPY+ et contrôlant les démangeaisons mécaniques, transitent vers le cerveau par des voies différentes de celles activées pour induire les démangeaisons chimiques.

### Mécanisme d'inhibition des démangeaisons mécaniques

La caractérisation des interneurons NPY+ et plus généralement du circuit spinal contrôlant les démangeaisons mécaniques, a été entreprise grâce à l'injection de traceurs trans-synaptiques<sup>5</sup> dans la peau, pour identifier les neurones sensoriels des ganglions rachidiens dorsaux qui les connectent. Les résultats obtenus montrent que les neurones inhibiteurs exprimant NPY::Cre+ reçoivent majoritairement des projections sensorielles provenant des neurones mécanorécepteurs innervant spécifiquement la peau velue. Par une analyse comparative *in vivo* de l'activité électrique au sein de la corne dorsale de la moelle épinière chez des souris contrôles et des souris dépourvues de neurones NPY::Cre+, une activité spinale aberrante suite à une stimulation mécanique légère au niveau de la peau velue mais pas de la peau glabre, a pu être mise en évidence chez les animaux transgéniques. De plus, une stimulation mécanique douloureuse (par pincement) au niveau de la peau - velue ou glabre - ne provoque pas de changement significatif de l'activité spinale

<sup>4</sup> Le système de recombinaison Cre-lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxP (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.

<sup>5</sup> Traceurs neuroanatomiques passant les synapses neuronales, permettant d'identifier par marquage les neurones connectés à ceux dans lesquels ils sont injectés.



**Figure 2. Différents circuits pour les démangeaisons mécaniques et chimiques.** Représentation schématique simplifiée des différents circuits spinaux de la démangeaison. L'activation des mécanorécepteurs de bas seuil peut induire une forme de démangeaison dite mécanique. L'absence des neurones inhibiteurs exprimant NPY::Cre au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière entraîne la désinhibition de neurones excitateurs non identifiés (?) et l'appari-

tion de démangeaisons mécaniques chroniques. Les démangeaisons dues aux irritants chimiques sont induites par l'activation des neurones périphériques pruritocepteurs. Elles transitent au niveau spinal par les neurones excitateurs exprimant le récepteur GRPR, son ligand GRP et le récepteur NPRA. Ces démangeaisons sont contrôlées par les neurones inhibiteurs exprimant le facteur de transcription Bhlhb5 via l'activation de neurones nocicepteurs. Ces deux formes de démangeaisons sont transmises au cerveau via des neurones de projection spinale (NPS). GRPR : *gastrin releasing peptide receptor* ; GRP : *gastrin releasing peptide* ; NPRA : *natriuretic peptide receptor-A*.

chez les souris dépourvues de neurones NPY::Cre+, confirmant ainsi nos résultats comportementaux. Ces données révèlent ainsi que les interneurons NPY+ jouent un rôle spécifique dans le traitement des informations sensorielles du toucher léger émanant de la peau velue.

### Conclusions et perspectives

Ces résultats, ainsi que d'autres travaux récents, mettent en évidence l'existence d'au moins deux circuits distincts impliqués dans le contrôle des démangeaisons au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Figure 2). Les interneurons inhibiteurs NPY::Cre+ sont spécifiquement requis pour le contrôle des démangeaisons induites par des stimuli mécaniques [5], alors que celles induites par les agents chimiques irritants seraient contrôlées par les interneurons inhibiteurs Bhlhb5 (*basic helix-loop-helix domain containing, class B, 5*)-dépendants [11]. L'identification de ce nouveau circuit souligne l'importance du contrôle fin au niveau spinal des informations sensorielles du toucher léger émanant de la peau velue, en

particulier pour la sensation de démangeaison et de ses pathologies associées. Plusieurs questions restent cependant encore en suspens, telles que l'identité précise des neurones excitateurs impliqués dans la transmission des démangeaisons mécaniques ainsi que celle des neurones sensoriels responsables de ces démangeaisons. Dans l'avenir, l'élucidation des différents composants de ce circuit devrait conduire à une meilleure compréhension des circuits de la démangeaison et certainement permettre le développement de nouvelles thérapies dans le traitement des démangeaisons chroniques. Ces résultats illustrent donc la grande complexité et la diversité des réseaux neuronaux au sein de la corne dorsale de la moelle épinière, dans laquelle différents sous-groupes d'interneurons sont spécifiquement requis pour le traitement, l'intégration et la modulation des différentes informations sensorielles provenant de la périphérie. ♦

**A subpopulation of interneurons in the dorsal spinal cord involved in mechanical itch**

### LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Gross MK, Dottori M, Goulding M. *Lbx1* specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* 2002 ; 34 : 535-49.
2. Muller T, Brohmann H, Pierani A, et al. The homeodomain factor *Lbx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 2002 ; 34 : 551-62.
3. Brohl D, Strehle M, Wende H, et al. A transcriptional network coordinately determines transmitter and peptidergic fate in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 2008 ; 322 : 381-93.
4. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 2010 ; 11 : 823-36.
5. Bourane S, Duan B, Koch SC, et al. Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. *Science* 2015 ; 350 : 550-4.
6. Duan B, Cheng L, Bourane S, et al. Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 2014 ; 159 : 1417-32.
7. Fukuoka M, Miyachi Y, Ikoma A. Mechanically evoked itch in humans. *Pain* 2013 ; 154 : 897-904.
8. Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 2007 ; 448 : 700-3.
9. Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, et al. Cellular basis of itch sensation. *Science* 2009 ; 325 : 1531-4.
10. Misery L. Le prurit : des avancées physiopathologiques considérables. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1123-8.
11. Ross SE, Mardinly AR, McCord AE, et al. Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron* 2010 ; 65 : 886-98.

## Un gène codant une métalloprotéase est pour la première fois impliqué dans l'hétérotaxie

Patrice Bouvagnet<sup>1</sup>, Anne Guimier<sup>2</sup>, Jeanne Amiel<sup>2</sup>, Christopher T. Gordon<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Inserm U1217, CNRS 5410, Université Lyon 1, 8, avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France ;

<sup>2</sup> Inserm U 1163, Institut Imagine, 24, boulevard Montparnasse, 75014 Paris, France. [patrice.bouvagnet@univ-lyon1.fr](mailto:patrice.bouvagnet@univ-lyon1.fr)



### L'hétérotaxie

La latéralisation des organes thoraciques et abdominaux est un processus fondamental du développement embryonnaire. Elle survient après la mise en place des axes crânio-caudal et dorso-ventral. Le premier organe à se latéraliser est le cœur. Celui-ci n'est initialement qu'un tube, orienté selon l'axe crânio-caudal, dont la croissance longitudinale va excéder celle de l'embryon. Il commence alors à former une courbe vers la droite, ce qui constitue le premier événement de latéralisation de l'embryon. Les arcs vasculaires qui sont situés entre le futur cœur et la région céphalique vont, eux aussi, avoir une évolution différente dans la partie droite et la partie gauche de l'embryon [1] (→).

L'intestin, lui, va subir un mouvement de rotation comme en témoigne son parcours dans l'abdomen, et l'estomac va se retrouver du côté gauche et le foie du côté droit. Cette organisation finale est observée chez la majorité des individus. Cependant, pour certains individus, la latéralisation est parfaitement inversée : le cœur et l'estomac sont situés à droite, le foie à gauche. Cette inversion complète, en miroir, des organes thoraciques et abdominaux, appelée *situs inversus totalis*, est-elle pénalisante ? La réponse est non. Il n'y a aucun handicap à être parfaitement inversé, sauf qu'en cas d'appendicite, la douleur abdominale serait située à gauche et non à droite ! Cependant une inversion partielle de la

latéralisation (ou *situs ambiguus*) est une cause de morbidité et de mortalité, car presque toujours associée à une malformation cardiovasculaire [2] (→).

Celle-ci peut être grave et nécessiter, pour assurer une survie, une chirurgie palliative afin d'ob-

(→) Voir la Synthèse de N. Diguët et S. Meilhac, *m/s* n° 11, novembre 2014, page 996

tenir une amélioration partielle de la circulation sanguine. L'inversion complète (*situs inversus totalis*) et l'inversion partielle (*situs ambiguus*) sont regroupées sous le terme d'hétérotaxie (*heteros* : différent et *taxos* : position), bien que les anglo-saxons préfèrent utiliser le terme hétérotaxie (*heterotaxy*) comme synonyme de *situs ambiguus*.

L'autre circonstance dans laquelle une hétérotaxie est pénalisante est lorsqu'elle est associée à des infections respiratoires récidivantes. Celles-ci sont dues à une dysfonction des cils situés au pôle apical des cellules épithéliales qui tapissent les voies aériennes supérieures (sinus) et inférieures (trachée, bronches). Le rôle de ces cils est d'évacuer, grâce à un mouvement équivalent à une hola dans un stade de football, les particules microbiennes que nous inhalons en respirant. Cette dysfonction est appelée dyskinésie ciliaire primitive. Quel est le lien entre l'hétérotaxie et la dyskinésie ciliaire ? Les embryons de vertébrés ont presque tous une dépression à la surface de l'endoderme, appelée le nœud embryonnaire (et la vésicule de Küpffer chez les poissons), au fond duquel se trouve un tapis de cellules présentant

un seul cil orienté vers la partie caudale de l'embryon (Figure 1A). Contrairement aux cils des muqueuses respiratoires qui ont un mouvement de type « essuie-glace », le monocil embryonnaire présente un mouvement de rotation qui génère un flux de liquide péri-embryonnaire de la droite vers la gauche de l'embryon (Figure 1B). Ce flux liquidien est responsable du début d'une signalisation moléculaire différentielle entre la droite et la gauche, bien avant l'apparition de la boucle cardiaque. Le dysfonctionnement de ce cil embryonnaire peut donc entraîner une hétérotaxie. Le lien entre l'hétérotaxie et la dyskinésie ciliaire primitive respiratoire est simplement le reflet de l'existence de protéines communes aux cils respiratoires et aux cils embryonnaires. En conséquence, une mutation qui altère la synthèse d'une protéine commune aux deux cils peut se traduire par une hétérotaxie et une dyskinésie ciliaire (syndrome de Kartagener [3]) (→).

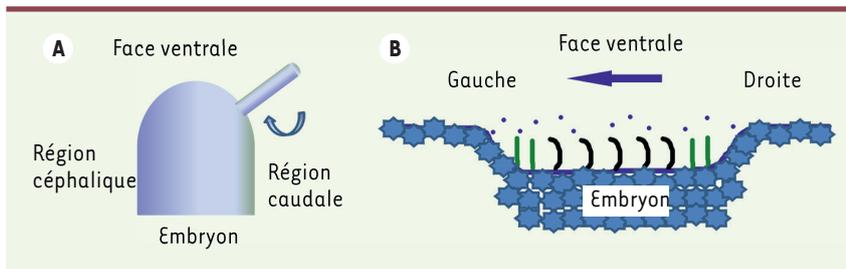
La plupart des gènes qui ont, jusqu'à présent, été impliqués dans l'hétérotaxie chez

(→) Voir la Synthèse de R. Bachmann-Gagescu, *m/s* n° 11, novembre 2014, page 1011

l'homme sont soit des gènes codant des protéines du cil embryonnaire, soit des gènes codant des protéines impliquées dans des étapes de la latéralisation en aval de l'étape du cil embryonnaire (pour une revue voir [4]).

### Le gène *MMP21*

Dans une étude récente [5], des jumeaux dizygotes (un garçon et une fille), issus



**Figure 1.** Schéma présentant le nœud embryonnaire et les cellules monociliées. **A.** Schéma d'une cellule tapissant le plancher du nœud embryonnaire. Son unique cil n'est pas implanté au sommet de la cellule et possède une orientation vers la région caudale. **B.** Le mouvement de rotation des cils du nœud embryonnaire génère un courant de liquide péri-embryonnaire de la droite de l'embryon vers la gauche de l'embryon.

de parents non apparentés, présentaient tous les deux une malformation cardiovasculaire complexe, associée à une hétérotaxie et sans signe respiratoire laissant suggérer une atteinte des cils respiratoires. Un séquençage exomique (c'est-à-dire un séquençage de toutes les parties codant les protéines du génome humain) de l'ADN germlinal des deux enfants a permis de découvrir une mutation d'origine paternelle et une mutation d'origine maternelle dans le gène *MMP21*. Après séquençage de ce gène dans une série de cas de malformations cardiovasculaires avec hétérotaxie (pour 154 patients) ou sans hétérotaxie (pour 110 patients), sept autres cas familiaux ont été identifiés, le plus souvent dans un contexte de consanguinité parentale (5/7 cas). Pour deux de ces familles, un génotypage a été effectué permettant de confirmer que les malades étaient bien homozygotes dans la région génomique contenant le gène *MMP21*. Dans une des familles consanguines, trois membres de la famille étaient porteurs homozygotes de la mutation *MMP21* familiale. L'un avait un *situs inversus totalis* et ne souffrait donc de rien, un autre avait une malformation cardiovasculaire pour laquelle il était traité et enfin, le dernier n'avait pas d'hétérotaxie (disposition classique des organes ou *situs solitus*) ni de malformation cardiovasculaire, démontrant que l'impact de ces mutations est extrêmement variable. Pour

ces huit familles identifiées, aucun des malades ne souffrait d'autres signes que ceux liés à l'hétérotaxie, suggérant que les mutations du gène *MMP21* n'altèrent pas d'autres mécanismes cellulaires que celui lié à la latéralisation. En plus de ces huit familles, un cas familial supplémentaire hispano-américain est rapporté dans l'article de Guimier *et al.* [5], ainsi que trois autres cas, dont deux familiaux, dans d'autres études indépendantes [6, 7].

*MMP21* code une protéine probablement sécrétée car elle présente une région amino-terminale contenant un peptide signal<sup>1</sup>. Cette protéine a une structure similaire à d'autres métalloprotéases avec (1) un prodomaine auto-inhibiteur, qui est probablement clivé près du site de son activité, (2) un domaine catalytique peptidase et (3) quatre domaines hémopexine<sup>2</sup> du côté carboxy-terminal, impliqués dans la reconnaissance du substrat de cette enzyme (Figure 2). L'expression de cette métalloprotéase est observée dans de multiples tissus embryonnaires et adultes, ainsi que dans des tumeurs cancéreuses [8]. Les mutations rapportées ont été trouvées dans tous les domaines de la protéine (Figure 2) [5-7], démontrant que celle-ci doit être intègre pour fonctionner normalement.

<sup>1</sup> Chaîne peptidique d'une protéine servant à adresser celle-ci à un compartiment cellulaire particulier, comme les vésicules de sécrétion par exemple.

<sup>2</sup> Glycoprotéine se liant aux hèmes.

Différents modèles animaux ont permis d'étudier la fonction de *MMP21*. Tout d'abord, chez des embryons de poisson zèbre, l'utilisation de la technique d'hybridation *in situ*<sup>3</sup> a révélé que la transcription de *MMP21* est strictement restreinte à la région de la vésicule de Küpffer (c'est-à-dire l'équivalent du nœud embryonnaire de l'homme et de la souris). De plus, l'injection de morpholinos<sup>4</sup> bloquant l'épissage ou la traduction d'ARNm de *MMP21*, induit l'apparition d'anomalies de la boucle cardiaque chez les embryons de poisson zèbre au stade 48h post-fertilisation. Chez la souris, des mutations du gène *MMP21*, obtenues soit par mutagenèse aléatoire chimique avec le N-nitroso-N-éthylurée (ENU) [9], soit par mutagenèse ciblée avec la technologie CRISPR/Cas9 [10] (→) provoquent une hétérotaxie. Son hérédité est récessive, comme chez l'homme, et une pénétrance incomplète<sup>5</sup> a été observée dans le modèle CRISPR/Cas9. Dans ces modèles, le cil du nœud embryonnaire fonctionnait normalement [6].

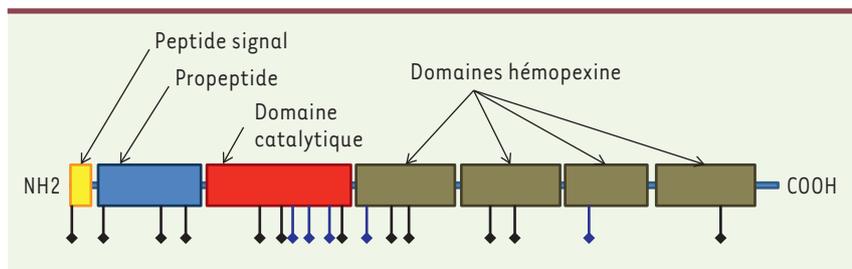
(→) Voir la Synthèse de J.P. Tremblay, m/s n° 11, novembre 2015, page 1014

Une étude phylogénétique a montré que le gène *MMP21* n'est pas fonctionnel dans le génome de tous les vertébrés. Il est en effet non fonctionnel dans le génome des oiseaux, des reptiles et des cétartiodactyles (comme le porc). Or, il semble que le nœud embryonnaire de ces dernières espèces est couvert par de l'endoderme et non pas par un liquide péri-embryonnaire. La latéralisation chez les oiseaux, les reptiles et les cétartiodactyles serait donc établie par un mouvement circulaire des cellules autour du nœud embryonnaire.

<sup>3</sup> Technique permettant de localiser une séquence de nucléotides sur une coupe histologique.

<sup>4</sup> Molécule synthétique antisens d'environ 25 bases qui se fixe aux séquences complémentaires d'ARN par appariement de bases. Le morpholino peut être utilisé pour bloquer la traduction ou modifier l'épissage du préARNm et ainsi diminuer ou invalider l'expression d'un gène.

<sup>5</sup> La pénétrance d'une maladie génétique correspond à la proportion d'individus possédant un génotype donné qui exprime le phénotype correspondant. La pénétrance est incomplète lorsque des individus de génotypes identiques n'expriment pas tous le même phénotype.



**Figure 2.** Schéma indiquant les différents domaines de la métalloprotéase MMP21. L'emplacement des mutations est symbolisé en-dessous de la protéine, avec en noir les mutations de l'article de Guimier *et al.* [5], et en bleu les mutations rapportées dans deux autres articles [6, 7].

### Conclusion

Cette étude a mis en évidence pour la première fois le rôle d'une métalloprotéase dans la latéralisation de la plupart des vertébrés. Le substrat de cette métalloprotéase est à ce jour inconnu. La prévalence élevée (5,9 %) de mutations de *MMP21* dans notre groupe de patients atteints d'hétérotaxie avec ou sans malformation cardiaque place ce gène en première position des gènes responsables d'hétérotaxie devant le gène *ZIC3* (*zic family member 3*, environ

3 % des cas). La pénétrance, quoique incomplète, est très élevée (environ 90% dans notre groupe de patients) et donc bien supérieure à la pénétrance de l'hétérotaxie lorsqu'un gène codant une protéine du cil embryonnaire est impliqué (pénétrance de 50 %). ♦

**A gene coding for a metalloprotease for the first time implied in heterotaxy**

### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Bajolle F, Zaffran S. Le débit cardiaque, acteur majeur de la morphogénèse asymétrique des arcs aortiques. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 354-6.
2. Diguët N, Meilhac SM. Cils et morphogénèse cardiaque. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 996-1003.
3. Bachmann-Gagescu R. Complexité génétique des ciliopathies et identification de nouveaux gènes. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1011-23.
4. Liu H, Jimenez G, El Malti R, *et al.* Défauts de latéralisation et hétérotaxie. *EMC-Cardiologie* 2014 ; 9 : 1-14.
5. Guimier A, Gabriel GC, Bajolle F, *et al.* MMP21 is mutated in human heterotaxy and is required for normal left-right asymmetry in vertebrates. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1260-3.
6. Akawi N, McRae J, Ansari M, *et al.* Discovery of four recessive developmental disorders using probabilistic genotype and phenotype matching among 4,125 families. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 1363-9.
7. Perles Z, Moon S, Ta-Shma A, *et al.* A human laterality disorder caused by a homozygous deleterious mutation in MMP21. *J Med Genet* 2015 ; 52 : 840-7.
8. Ahokas K, Lohi J, Lohi H, *et al.* Matrix metalloproteinase-21, the human orthologue for XMMP, is expressed during fetal development and in cancer. *Gene* 2002 ; 301 : 31-41.
9. Li Y, Klena NT, Gabriel GC, *et al.* Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature* 2015 ; 521 : 520-4.
10. Tremblay JP. CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 1014-22.

### NOUVELLE

## Actine et annexine A2

### Partenaires essentiels pour le contrôle de la sécrétion neuroendocrine

Marion Gabel<sup>1</sup>, Franck Delavoie<sup>2</sup>, Nicolas Vitale<sup>1</sup>, Marie-France Bader<sup>1</sup>, Sylvette Chasserot-Golaz<sup>1</sup>

Le fonctionnement des systèmes nerveux et neuroendocrine repose sur une communication cellulaire élaborée soutenue par un trafic membranaire intense. Les molécules chimiques impliquées dans cette communication sont stockées dans des granules de sécrétion et libérées dans le milieu extracellulaire par fusion des granules avec la membrane plasmique, un processus appelé exocytose régulée [1]. Dans les cellules neuroendocrines, l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique,

puis leur fusion, se font au niveau de sites membranaires dont l'architecture est portée par des lipides spécifiques. Ces domaines lipidiques, aussi appelés radeaux lipidiques, correspondent aux sites d'exocytose de la membrane plasmique et peuvent se former de façon transitoire selon l'état d'activation des cellules [2]. Ils recrutent, activent ou séparent les acteurs de l'exocytose comme les protéines du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*),

<sup>1</sup> Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, CNRS - UPR 3212 et université de Strasbourg, 5, rue Blaise Pascal, F-67084, Strasbourg, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de biologie moléculaire eucaryote, UMR5099 CNRS-université de Toulouse III Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, F-31000, Toulouse, France.

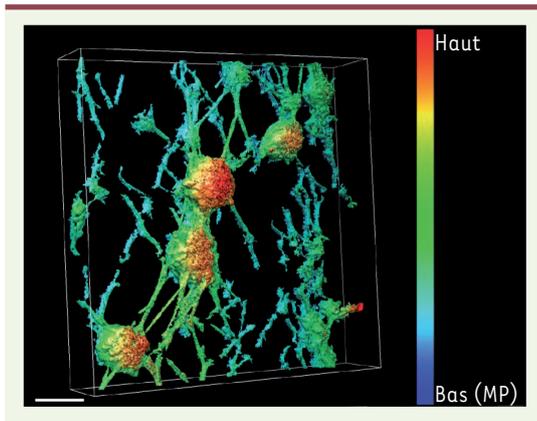
chasserot@inci-cnrs.unistra.fr

nécessaires à l'arrimage et à la fusion des granules à la membrane plasmique [3, 4] (→).

L'annexine A2 a été l'une des premières protéines identifiée au niveau des sites d'exocytose [5]. Elle fait partie

(→) Voir la Synthèse de T. Galli *et al.*, *m/s* n° 11, novembre 2002, page 1113 et la Nouvelle de O. El Far et M. Seagar, *m/s* n° 1, janvier 2011, page 28

de la famille des annexines, protéines capables de s'associer aux membranes biologiques en présence de calcium. Une des particularités de l'annexine A2



**Figure 1. Organisation du cytosquelette d'actine au niveau des sites d'exocytose dans une cellule chromaffine.** Représentation en trois dimensions obtenue par tomographie électronique d'un granule de sécrétion ancré à la membrane plasmique dans une cellule chromaffine stimulée par un sécrétagogue. L'échelle de fausses couleurs correspond aux différents plans

tomographiques, le plan le plus bas représente la membrane plasmique (bleu). Barre : 100 nm.

est sa capacité à lier simultanément les phospholipides et le cytosquelette d'actine [6], deux acteurs majeurs de l'exocytose. Bien que de nombreuses études aient suggéré un rôle important de l'annexine A2 au cours de l'exocytose, sa fonction précise est restée longtemps énigmatique. Dans des cellules chromaffines<sup>1</sup>, modèle classiquement utilisé pour étudier les modalités moléculaires de la sécrétion neuroendocrine, nous avons montré que l'annexine A2 est à l'origine de domaines lipidiques, riches en ganglioside<sup>2</sup> GM1 et en phosphoinositides, nécessaires à l'exocytose [7, 8]. Nos travaux récents révèlent comment l'annexine A2, en établissant un étroit partenariat avec le cytosquelette d'actine, forme des plateformes lipidiques dont le rôle est le recrutement spatio-temporel de différents acteurs de l'exocytose [9].

### Un nouveau rôle pour le cytosquelette d'actine au cours de la sécrétion neuroendocrine

Le cytosquelette d'actine est un acteur majeur de la sécrétion neuroendocrine. Dans les cellules au repos, l'actine forme un réseau dense de filaments, sous la membrane plasmique, qui for-

ment une barrière physique dont la fonction classique est d'empêcher le recrutement inopiné des granules à la membrane plasmique. Différentes études fonctionnelles, basées sur la détection de filaments d'actine au niveau des sites d'exocytose dans les cellules chromaffines, suggèrent que l'exocytose nécessite aussi une intervention active de l'actine [10]. Nous avons récemment mis au point une technique permettant d'observer au microscope électronique la face cytoplasmique de la membrane plasmique d'une cellule chromaffine en cours d'exocytose. Les images en trois dimensions de ces feuilletts membranaires révèlent des granules de sécrétion, arrimés à la membrane plasmique par des câbles d'actine, au niveau de domaines lipidiques enrichis en ganglioside GM1 (Figure 1). Ces images inédites nous ont permis d'observer pour la première fois l'organisation de l'actine au voisinage des sites d'exocytose. Différentes structures apparaissent : des filaments d'actine parallèles à la membrane plasmique (Figure 1, en bleu) dont le rôle pourrait être de former et/ou de stabiliser la plateforme lipidique ; des filaments de type cordons, plus épais, semblant ancrer le granule à la membrane plasmique (Figure 1, en vert) ; et finalement un manteau d'actine recouvrant partiellement la surface du granule (Figure 1, en rouge). Ces structures d'actine

semblent constituer un réseau dynamique autour du granule de sécrétion pour permettre le bon déroulement des différentes étapes de l'exocytose [11]. De fait, la possibilité de mesurer la sécrétion à l'échelle d'un granule par la technique d'ampérométrie<sup>3</sup>, nous a permis d'obtenir des données fonctionnelles indiquant la participation de l'actine, non seulement au recrutement et à la fusion des granules de sécrétion à la membrane plasmique, mais aussi directement à la libération du contenu granulaire, vraisemblablement en compressant, telle une éponge, les granules ancrés à la membrane.

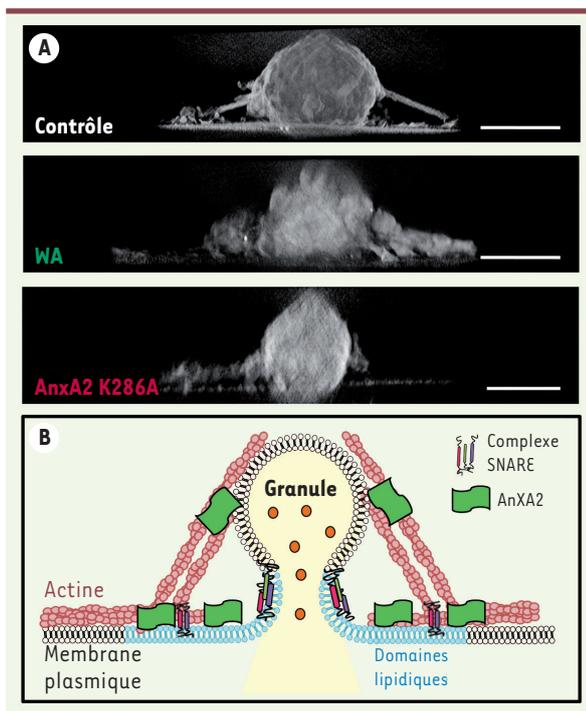
### L'annexine A2, protéine-clé pour une mise en place des sites d'exocytose

L'annexine A2 est capable, en présence de calcium, d'assembler plusieurs filaments d'actine pour en faire des câbles et des faisceaux. Nous avons donc étudié si cette propriété de fasciculation de l'actine pouvait être en lien avec la formation des plateformes lipidiques nécessaires à la sécrétion. Deux approches complémentaires ont été choisies pour tenter de répondre à cette question : d'une part, une approche pharmacologique utilisant la withaférine A, une lactone extraite de *Withania somnifera*, généralement utilisée dans le traitement de certains cancers et des troubles neurologiques, et qui stimule l'activité de fasciculation de l'actine de l'annexine A2 ; et d'autre part, une approche génétique basée sur l'expression d'un mutant de l'annexine A2 (AnxA2K286A) incapable de former des faisceaux d'actine. L'observation de feuilletts membranaires de cellules chromaffines, exposées à la withaférine A ou exprimant le mutant AnxA2K286A de l'annexine A2, montre que le réseau

<sup>1</sup> Les cellules chromaffines sont des cellules neuroendocrines présentes dans les glandes médullosurrénales et dans les ganglions du système nerveux sympathique. Elles tirent leur nom de la coloration qu'elles prennent en présence de sels de chrome.

<sup>2</sup> Lipides de la famille des glycosphingolipides.

<sup>3</sup> Méthode électrochimique permettant d'enregistrer les événements d'exocytose sur cellule unique. Une électrode en fibre de carbone, maintenue à un potentiel imposé de 800 mV permettant l'oxydation des catécholamines, est appliquée sur la surface de la cellule pour mesurer le courant électrique produit par l'oxydation des catécholamines libérées dans le milieu [12].



**Figure 2. Formation de faisceaux d'actine par l'annexine A2 au cours de l'exocytose.** **A.** Granules de sécrétion arrimés à la membrane plasmique stimulée (contrôle), traitée à la Withaférine A (WA) ou exprimant le mutant de l'annexine A2 (AnxA2 K286A). Vues de profil obtenues par tomographie électronique. Barre : 200 nm. **B.** Représentation schématique du mode d'action de l'annexine A2 au cours de l'exocytose.

d'actine au niveau des sites d'exocytose est altéré (Figure 2A). La stimulation de l'activité de fasciculation de l'annexine A2 par la withaférine A épaissit les faisceaux d'actine entourant les granules arrimés à la membrane plasmique. À l'inverse, l'expression du mutant d'annexine A2 dépourvu d'activité de fasciculation produit une désorganisation de l'actine et une disparition des filaments d'ancrage des granules de sécrétion à la membrane plasmique. En parallèle, la formation des domaines lipidiques et l'activité d'exocytose sont modifiées. Une stimulation de la fasciculation de l'actine par l'annexine A2 conduit à une augmentation du nombre de domaines lipidiques et de granules ancrés à la membrane plasmique, et à une accélération de l'étape de fusion. À l'inverse, l'incapacité de l'annexine A2 à former des faisceaux d'actine se traduit par une réduction de la formation de domaines lipidiques et du nombre d'événements d'exocytose. L'activité de fasciculation de l'actine par l'annexine A2 joue ainsi un rôle déterminant dans la mise en place des plateformes lipidiques et la cinétique des étapes de l'exocytose [11].

### Conclusions et perspectives

Cette première description tridimensionnelle des faisceaux d'actine formés par l'annexine A2 au niveau des sites d'exocytose représente une avancée majeure dans la compréhension des étapes ultimes de la sécrétion neuroendocrine. La formation de faisceaux d'actine par l'annexine A2, en limitant possiblement la mobilité et la diffusion latérale dans la membrane plasmique, joue ainsi un rôle essentiel dans la formation des domaines lipidiques, l'assemblage et/ou la maturation des sites d'exocytose (modèle présenté en Figure 2B). Cette fonction confère à l'annexine A2 un rôle pivot de régulateur de l'activité sécrétrice et de la libération hormonale.

Élucider le rôle de l'annexine A2 dans les circuits de l'exocytose complète nos connaissances des mécanismes de la sécrétion neuroendocrine et de la neurotransmission, et, plus généralement, permet de comprendre les mécanismes de formation et de régulation des domaines lipidiques dans les membranes biologiques. Il est évident que ces mécanismes sont directement couplés au contrôle spatial et temporel de la

transduction du signal. La compréhension de la genèse de ces domaines lipidiques au niveau moléculaire représente une avancée majeure en neurobiologie, particulièrement pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de traiter certaines neuropathologies [13]. ♦

### Actin and annexin A2: Essential partners for the control of neuroendocrine secretion

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 2012 ; 490 : 201-7.
2. Chamberlain LH, Burgoyne RD, Gould GW. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 5619-24.
3. Galli T, Martinez-Arcal S, Paumet F. Mécanisme de la fusion membranaire. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 1113-9.
4. El Far O, Seagar M. SNARE, V-ATPase et neurotransmission. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 28-31.
5. Nakata T, Sobue K, Hirokawa N. Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 1990 ; 110 : 13-25.
6. Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 2013 ; 14 : 6259-305.
7. Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, et al. Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 2005 ; 16 : 1108-19.
8. Umbrecht-Jenck E, Demais V, Calco V, et al. S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic* 2010 ; 11 : 958-71.
9. Menke M, Gerke V, Steinem C. Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 2005 ; 44 : 15296-303.
10. Gutierrez LM. New insights into the role of the cortical cytoskeleton in exocytosis from neuroendocrine cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012 ; 295 : 109-37.
11. Gabel M, Delavoie F, Demais V, et al. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 2015 ; 210 : 785-800.
12. Mosharov EV, Sulzer D. Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 651-8.
13. Schengrund CL. Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain Res Bull* 2010 ; 82 : 7-17.

## Génétique de la schizophrénie

### Le complément, facteur de risque ?

Dominique Campion<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre hospitalier du Rouvray,  
4, rue Paul Eluard,  
76301 Sotteville-lès-Rouen, France ;

<sup>2</sup> Inserm U1079, Génétique médicale  
et fonctionnelle du cancer et des maladies neuropsychiatriques, 76183 Rouen, France.

[dominique.campion@univ-rouen.fr](mailto:dominique.campion@univ-rouen.fr)

► Durant des années, les études cas-témoins réalisées dans le but d'identifier des facteurs de risque génétique dans la schizophrénie, à partir de « gènes candidats », ont conduit à des résultats non reproductibles du fait de l'absence de rigueur statistique, notamment de la non prise en compte des tests multiples réalisés. En 2014, le *Psychiatric genomics consortium* (PGC) constitué par plusieurs dizaines d'équipes internationales a réuni une population d'environ 35 000 patients et 45 000 témoins à partir desquels a été menée une étude d'association à l'échelle du génome (*genome-wide association study*, GWAS) [1]. Ce type d'étude explore, sans hypothèse *a priori*, les associations relevées avec des variants fréquents (en pratique, avec une fréquence de l'allèle mineur supérieure à 5 %) répartis sur l'ensemble des chromosomes. Compte tenu de l'existence de blocs haplotypiques, où ces variants sont en déséquilibre de liaison, on considère que la plupart des régions chromosomiques où sont présents des variants fréquents montrant une association avec la maladie, peuvent être détectées avec une bonne fiabilité par ces approches en génotypant quelques centaines de milliers de variants seulement. En outre, les résultats peuvent être efficacement corrigés pour les tests multiples effectués avec, en corollaire, la nécessité de disposer de tailles d'échantillon très importantes pour parvenir à franchir le seuil de significativité *genome-wide*. Dans le cas présent, 108 locus associés à la schizophrénie ont été mis en évidence. Identifier une région avec un signal d'association positif n'équivaut toutefois pas à identifier un gène responsable. Dans 10 cas seulement, ce signal a pu être attribué à un variant

non synonyme exonique (intéressant une exon). Dans les autres cas le signal était localisé hors des régions codantes, parfois à grande distance de gènes connus, suggérant que les variants détectés par GWAS affectent plus volontiers la régulation de l'expression génique plutôt que la structure protéique. Pour rendre les choses plus complexes encore, plusieurs signaux étaient souvent présents au sein d'une même région, rendant impossible de décider lequel sous-tendait l'effet biologique. Pour commencer à avancer sur ces questions Sekar et ses collaborateurs [2] ont concentré leurs efforts sur la région donnant le signal d'association le plus fort, une région de 3,6 mégabases située sur le chromosome 6 et correspondant au complexe majeur d'histocompatibilité. Ils ont montré qu'au sein de cette région contenant notamment les gènes HLA (*human leukocyte antigen* - en français, complexe majeur d'histocompatibilité [CMH]) hautement polymorphes l'essentiel du signal était concentré autour des 2 gènes, C4A et C4B, codant le facteur 4 du complément. Cette microrégion est elle-même fort complexe puisque C4A et C4B varient en nombre de copies et existent en version courte ou longue, en raison de la présence, ou non, d'une insertion rétrovirale (HERV, *human endogenous retroviruses*) dans leur partie non codante. Cette insertion modifie l'expression du gène. Cependant, Sekar et ses collaborateurs sont parvenus à démêler cet écheveau en reliant ces caractéristiques structurales à des niveaux d'expression des gènes. Ils ont ensuite montré que différents niveaux de risque pour la schizophrénie étaient liés à différentes combinaisons entre le nombre de copies

de C4 et le statut HERV : globalement, plus le niveau prédit d'expression de C4A est haut, plus le risque croît.

### Une explication physiopathologique ?

C4 est un constituant de la cascade du complément qui permet au système immunitaire inné de reconnaître débris cellulaires et pathogènes. Il est exprimé, en particulier, dans les astrocytes et les neurones. Du fait de sa localisation dans les synapses, il a été suggéré qu'il joue, au cours du développement, un rôle physiologique dans le processus d'élagage des synapses permettant l'élimination de celles sous-utilisées. Pour tester cette hypothèse Sekar et ses collaborateurs ont étudié un modèle de souris déficiente pour C4. Il faut noter à ce propos, que si chez l'homme, 2 gènes, C4A et C4B, sont responsables de l'activation du facteur C3, permettant à ce dernier de se lier à ses cibles et de promouvoir leur phagocytose, un seul gène C4 existe chez les rongeurs. Avec cette limitation, Sekar et ses collaborateurs ont pu montrer que les souris déficientes pour C4 ont un élagage synaptique réduit durant la maturation de leurs circuits neuronaux. À l'inverse, le facteur C4 est régulé positivement durant les périodes d'élagage. Ils spéculent alors que chez les patients, l'expression augmentée de C4A conduirait à un excès néfaste d'élagage. Les auteurs relient ces faits aux multiples travaux ayant documenté, chez des patients schizophrènes, un amincissement anormal du cortex associatif<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Le cortex associatif est un ensemble de régions cérébrales qui interviennent dans le traitement des informations complexes.



sans qu'il n'y ait de perte cellulaire, ainsi qu'une diminution du nombre de synapses sur les neurones pyramidaux. Ils soulignent que, chez l'homme, la période cruciale pour l'élagage se situe durant l'adolescence et chez l'adulte jeune, ce qui corrèle avec l'âge de survenue de la schizophrénie. Évidemment, tout ceci demande confirmation mais

impulsera sans nul doute des recherches visant à mieux comprendre cet aspect de la maturation neuronale. ♦

### Genetics of schizophrenia: is the complement component 4 a risk factor?

#### LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Schizophrenia working group of the psychiatric genomics consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014 ; 511 : 421-7.
2. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 2016 ; 530 : 177-83.

#### NOUVELLE

## Le rôle critique de la PI3-kinase dans la traversée des barrières de l'hôte par *Listeria monocytogenes*

Grégoire Gessain<sup>1-3</sup>, Olivier Disson<sup>1,2</sup>, Marc Lecuit<sup>1,2,4,5</sup>

► *Listeria monocytogenes* (*Lm*) est responsable de la listériose humaine, une infection systémique d'origine alimentaire dont le taux de mortalité atteint 30%. Suite à l'ingestion d'aliments contaminés, *Lm* traverse l'épithélium intestinal, dissémine par voie sanguine, et atteint le système nerveux central et l'unité fœto-placentaire. *Lm* a donc la capacité de traverser les barrières intestinale, hémato-encéphalique et placentaire. Elle est à l'origine d'encéphalites et de méningites, ainsi que d'avortements et d'infections néonatales.

### Mécanismes d'invasion cellulaire : rôle d'InIA et d'InIB

*Lm* est une bactérie intracellulaire facultative<sup>1</sup>, qui est internalisée par les cellules non phagocytaires. Cette invasion est consécutive à l'interaction de deux protéines de surface bactérienne avec leurs récepteurs respectifs à la surface des cellules de l'hôte. Ces deux protéines bactériennes de surface sont l'internaline (InIA), qui interagit avec la E-cadhérine (Ecad), une protéine

permettant la formation des jonctions adhérentes entre cellules épithéliales, et InIB, qui interagit avec c-Met, le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGF) [1-4] (→).

L'interaction InIA-Ecad est associée à des réarrangements du cytosquelette d'actine nécessaires à l'entrée de

(→) Voir les Nouvelles de M. Lecuit et P. Cossart, *m/s* n° 12, décembre 2001, page 1333, et *m/s* n° 1, janvier 2005, page 17

la bactérie dans la cellule. Cette interaction est spécifique d'espèce : la Ecad humaine est reconnue par InIA, alors que la Ecad de souris ne l'est pas [5]. Pour les espèces chez lesquelles l'interaction InIA-Ecad est possible, telles que le cobaye, la gerbille, l'homme et les souris humanisées (qui expriment la Ecad humaine ou une Ecad murine humanisée par la substitution E16P<sup>2</sup>), InIA permet la traversée de l'épithélium intestinal [6, 7]. L'interaction InIB-c-Met mime la voie de signalisation cellulaire de l'HGF : elle active la PI3-K (phosphoinositide 3-kinase), qui est nécessaire à l'internalisation de *Lm* [8].

<sup>1</sup> Institut Pasteur, unité biologique des infections, 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris, France ;  
<sup>2</sup> Inserm, U1117, F-75015 Paris, France ;  
<sup>3</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, cellule Pasteur, F-75013 Paris, France ;  
<sup>4</sup> Institut Pasteur, centre national de référence et centre collaborateurs de l'OMS de *Listeria*, 28, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris, France ;  
<sup>5</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, service de maladies infectieuses et médecine tropicale, hôpital Necker-Enfants Malades, institut Imagine, F-75015 Paris, France.

[olivier.disson@pasteur.fr](mailto:olivier.disson@pasteur.fr)  
[marc.lecuit@pasteur.fr](mailto:marc.lecuit@pasteur.fr)

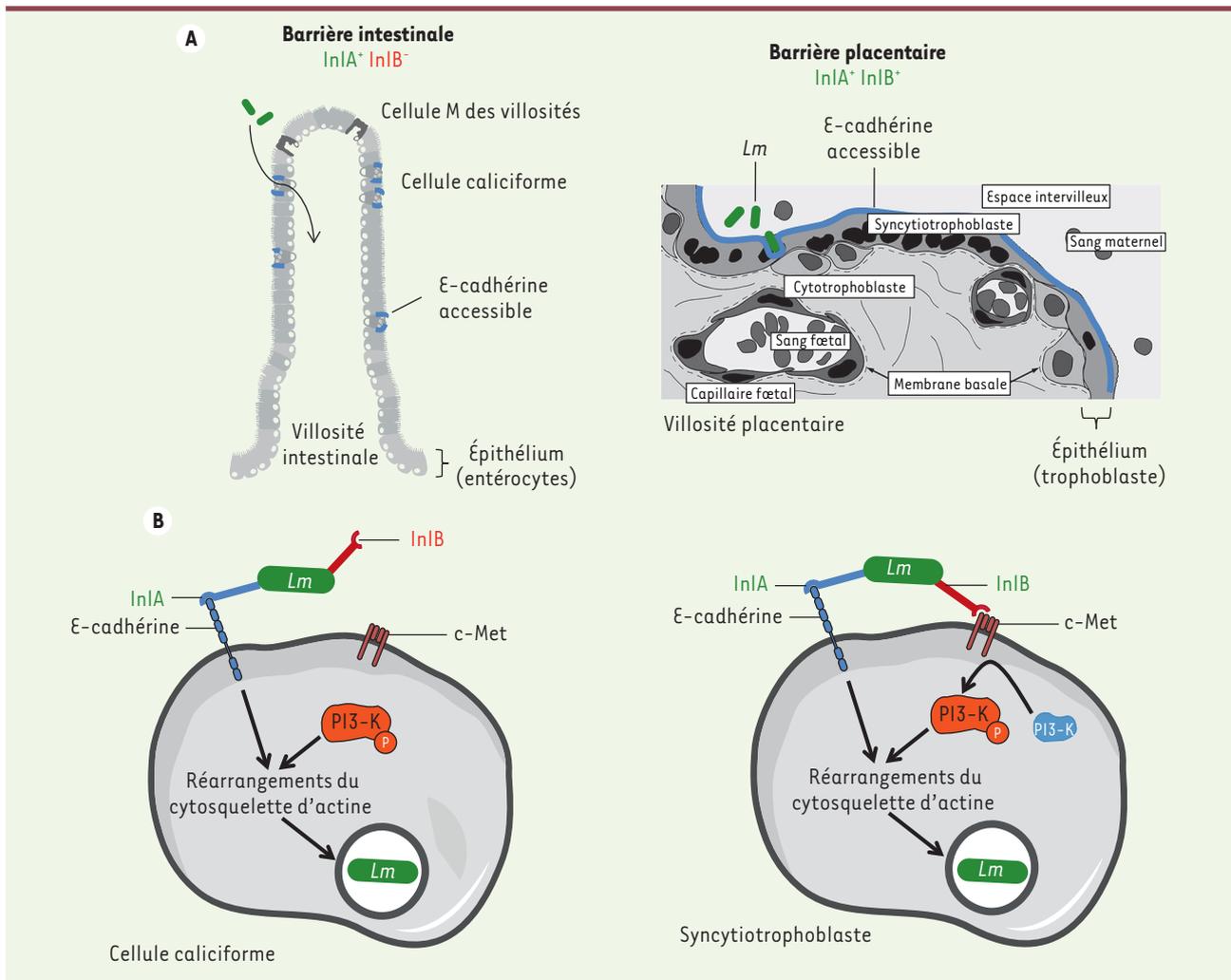
### *Lm* traverse les barrières intestinale et placentaire

InIA et InIB ont des contributions différentes lors du franchissement par *Lm* des barrières intestinale et placentaire. InIA est nécessaire et suffisante pour la traversée de l'épithélium intestinal. Elle interagit avec la Ecad située sur la face apicale des cellules caliciformes (CC) sécrétrices de mucus et accessible à leur face luminale (Figure 1A) [9]. InIB, elle, n'est pas impliquée dans la traversée de la barrière intestinale [10]. En revanche, la traversée de la barrière placentaire requiert l'action conjointe et interdépendante d'InIA et d'InIB (Figure 1A) [7, 11].

Nous avons étudié les bases moléculaires et cellulaires des rôles respectifs d'InIA et d'InIB dans la traversée par *Lm* des barrières intestinale et placentaire. Notre hypothèse de travail était la suivante : l'activité de la PI3-K étant nécessaire à l'internalisation de *Lm*, cette enzyme serait

<sup>1</sup> Bactérie pouvant se multiplier au sein ou en dehors d'une cellule eucaryote.

<sup>2</sup> Substitution de l'acide glutamique (E) en position 16 par une proline (P).



**Figure 1. Traversée dépendante d'InIA des cellules caliciformes intestinales et traversée dépendante d'InIA et d'InIB des cellules épithéliales placentaires.** **A.** Schéma histologique simplifiée d'une villosité intestinale (gauche) et d'une villosité placentaire (droite). L'épithélium de la villosité intestinale est constitué d'entérocytes, de cellules caliciformes sécrétrices de mucus et de cellules M. Les cellules caliciformes expriment de la É-cadhérine accessible à la lumière intestinale. La villosité placentaire est recouverte d'un épithélium appelé syncytiotrophoblaste, résultat de la fusion des cellules du cytotrophoblaste sous-jacentes. Le syncytiotrophoblaste exprime de la É-cadhérine accessible au sang maternel dans lequel se trouvent les bactéries. *Listeria monocytogenes* traverse les cellules caliciformes sécrétrices de mucus de l'intestin ainsi que le syncytiotrophoblaste du placenta. **B.** La PI3-kinase est constitutivement activée dans les cellules caliciformes intestinales, InIA seule est donc suffisante à l'invasion bactérienne. La PI3-kinase est faiblement activée dans le syncytiotrophoblaste, ce qui explique l'action conjointe d'InIA et d'InIB pour l'invasion cellulaire de *Lm*. InI : internaline ; PI3-K : phospho-inositide 3-kinase ; *Lm* : *Listeria monocytogenes*.

activée constitutivement dans les cellules intestinales ciblées par *Lm*, expliquant l'absence de rôle d'InIB dans la traversée de l'épithélium intestinal ; en revanche au niveau placentaire, elle ne serait pas activée constitutivement, et l'interaction InIB-c-Met serait nécessaire à son activation, permettant alors l'internalisation de *Lm*.

#### Activité de la PI3-K et entrée dépendante d'InIB *in vivo* et *in vitro*

Nous avons tout d'abord étudié l'activité de la PI3-K dans les cellules caliciformes (CC) ciblées par *Lm* pour traverser l'épithélium intestinal et démontré que ces cellules expriment effectivement une activité PI3-K constitutive. À l'inverse, le syncytiotrophoblaste constituant la barrière épithéliale des

villosités placentaires, en contact direct avec le sang maternel, n'exprime qu'un faible niveau basal d'activité PI3-K. Nous avons ensuite utilisé deux lignées cellulaires humaines pour étudier les entrées dépendantes d'InIA et d'InIB *in vitro* : des cellules intestinales sécrétrices de mucus, appelées LS174T, et des cellules trophoblastiques placentaires, appelées Jar. Nous avons montré que



la PI3-K est activée constitutivement dans les cellules intestinales mais pas dans les cellules placentaires. Ces deux lignées reflètent donc bien l'activité de la PI3-K observée *in vivo*.

Nous avons effectué des tests d'invasion *in vitro* pour étudier les entrées dépendantes d'InIA et d'InIB à l'aide de souches de *Lm* isogéniques<sup>3</sup> invalidées pour InIA (*Lm-ΔinIA*) ou InIB (*Lm-ΔinIB*). Dans les cellules intestinales LS174T, l'entrée de *Lm-ΔinIA* est réduite, tandis que l'entrée de *Lm-ΔinIB* n'est pas affectée, comme observé *in vivo*. Ce résultat montre qu'InIA est impliquée dans l'invasion des cellules intestinales dont la PI3-K est activée, alors qu'InIB n'y joue donc aucun rôle. Dans les cellules placentaires Jar, les entrées de *Lm-ΔinIA* et *Lm-ΔinIB* sont toutes deux réduites, attestant de la nécessité de l'action conjointe d'InIA et InIB pour l'invasion des cellules placentaires, dépourvues d'activité PI3-K basale.

Nous avons ensuite modulé l'activité de la PI3-K dans les deux lignées cellulaires et observé l'effet de cette modulation sur l'entrée dépendante d'InIB. Dans les cellules LS174T, l'inhibition de la pré-activation de la PI3-K entraîne une réduction de l'entrée de *Lm-ΔinIB* : le rôle d'InIB est donc révélé en l'absence d'activité constitutive PI3-K. Réciproquement, dans les cellules Jar pour lesquelles la PI3-K est artificiellement activée avant l'infection, l'entrée de *Lm-ΔinIB* augmente, témoignant de la réduction du rôle d'InIB à mesure que la PI3-K est pré-activée.

### InIB n'est pas impliquée dans la traversée de la barrière intestinale *in vivo*

Des résultats publiés précédemment par une autre équipe suggéraient un rôle d'InIB dans la traversée de la barrière intestinale [12]. Nous avons démontré que ces résultats étaient consécutifs aux biais des modèles utilisés dans cette

étude, et notamment l'utilisation de souris non humanisées inoculées avec une souche de *Lm* exprimant une version murinisée de InIA (*Lm-InIA<sup>m</sup>*) capable d'interagir avec la Écad murine [13]. Nous avons montré que cette souche reconnaît également la N-cadhérine de souris, située à la surface des cellules M des villosités (Mv) qui sont ainsi ciblées de façon non physiologique par *Lm-InIA<sup>m</sup>* [14]. Les Mv expriment une faible activité PI3-K, qui pourrait rendre compte de l'implication d'InIB dans ce modèle. Nos résultats indiquent en effet que *Lm-InIA<sup>m</sup>* envahit aussi bien les CC que les Mv, tandis que la souche *Lm-InIA<sup>m</sup>* invalidée pour InIB (*Lm-InIA<sup>m</sup>-ΔinIB*) n'envahit que les CC. Par conséquent, contrairement à un modèle murin humanisé permissif à InIA, dans lequel InIB ne joue aucun rôle dans la traversée de la barrière épithéliale intestinale, l'infection des souris sauvages par *Lm-InIA<sup>m</sup>* révèle un rôle artificiel d'InIB dans l'infection des Mv.

### InIB permet la traversée de l'épithélium placentaire humain *ex vivo*

Afin d'étudier le rôle d'InIB dans la traversée de l'épithélium placentaire humain, nous avons utilisé des explants placentaires humains, obtenus lors d'accouchements au terme de grossesses sans complication [11]. Nous avons observé une faible activité PI3-K constitutive dans le syncytiotrophoblaste. Nous avons également démontré que l'adhésion et l'invasion de *Lm-ΔinIA* est réduite, et que l'invasion de *Lm-ΔinIB* est également affectée. La séquence d'entrée dans l'épithélium placentaire humain répond donc au modèle suivant : *Lm* adhère de façon dépendante d'InIA à la surface des villosités placentaires grâce à l'interaction InIA-Écad, puis InIB active la PI3-K, ce qui permet l'internalisation des bactéries ayant adhéré. Ce modèle rend ainsi compte de la complémentarité des deux protéines bactériennes InIA et InIB dans l'invasion placentaire (Figure 1B).

## Conclusions

L'utilisation de *Lm* comme modèle d'étude des interactions hôte-pathogènes nous a permis de comprendre les implications respectives d'InIA et d'InIB dans la traversée des barrières intestinale et placentaire et de mettre en lumière le rôle crucial de la PI3-K dans la permisivité des barrières traversées par *Lm* (Figure 1B).

Ce travail a mis en évidence que la PI3-K est constitutivement activée dans les cellules calciformes. Cette enzyme, qui phosphoryle les phospho-inositides, est impliquée dans l'internalisation de nombreux microorganismes pathogènes, bactéries, virus ou parasites, suggérant que le niveau d'activité de la PI3-K puisse être un facteur critique contrôlant la traversée des barrières de l'hôte par les pathogènes. Les cellules calciformes pourraient ainsi constituer une porte d'entrée pour les autres entéro-pathogènes invasifs, et donc être une cible privilégiée de ces pathogènes. Par ailleurs, l'absence d'activité PI3-K dans l'épithélium placentaire illustre sa fonction de barrière face aux pathogènes, à l'exception de ceux qui ont évolué pour stimuler la PI3-K, tel que *Lm*. ♦

### PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Gaillard JL, Berche P, Frehel C, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 1991 ; 65 : 1127-41.
2. Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000 ; 103 : 501-10.
3. Lecuit M, Cossart P. Un modèle transgénique pour la listériose humaine : rôle de l'interaction entre l'internaline et la É-cadhérine dans la traversée de la barrière intestinale par *L. monocytogenes*. *Med Sci (Paris)* 2001 ; 17 : 1333-5.
4. Lecuit M, Cossart P. Bases moléculaires du tropisme fœtoplacentaire de *Listeria monocytogenes*. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 17-9.
5. Lecuit M, Dramsi S, Gottardi C, et al. A single amino acid in É-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* 1999 ; 18 : 3956-63.

<sup>3</sup> Souches identiques génétiquement à l'exception du gène invalidé.

## RÉFÉRENCES

- Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 2001 ; 292 : 1722-5.
- Disson O, Grayo S, Huillet E, et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* 2008 ; 455 : 1114-8.
- Ireton K, Payrastra B, Chap H, et al. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 1996 ; 274 : 780-2.
- Nikitas G, Deschamps C, Disson O, et al. Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *J Exp Med* 2011 ; 208 : 2263-77.
- Khelef N, Lecuit M, Bierre H, Cossart P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* 2006 ; 8 : 457-70.
- Lecuit M, Nelson DM, Smith SD, et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 6152-7.
- Pentecost M, Kumaran J, Ghosh P, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000900.
- Wollert T, Pasche B, Rochon M, et al. Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 2007 ; 129 : 891-902.
- Tsai YH, Disson O, Bierre H, Lecuit M. Murinization of internalin extends its receptor repertoire, altering *Listeria monocytogenes* cell tropism and host responses. *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003381.

## NOUVELLE

### La mystérieuse cible de la protéine virale Nef identifiée : les protéines SERINC3 et SERINC5

Lise Chauveau, Olivier Schwartz

Institut Pasteur, Unité Virus et Immunité, URA CNRS 3015, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. [schwartz@pasteur.fr](mailto:schwartz@pasteur.fr)

> Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) contient des gènes codant pour des protéines appelées accessoires. Contrairement aux protéines structurales, ces protéines ne sont pas des constituants de la particule virale. Elles sont cependant nécessaires à l'infection *in vivo*, chez l'homme ou dans des modèles animaux. Ces protéines accessoires sont en particulier capables de contrer l'action de protéines cellulaires, appelées facteurs de restriction, qui bloquent la réplication du virus à différentes étapes. Ainsi, la protéine Vif (*viral infectivity factor*) dégrade le facteur de restriction APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*) qui provoque des hypermutations de l'ADN viral [1]. Le facteur de restriction Tetherin/BST-2 (*bone marrow stromal antigen 2*) est incorporé dans la membrane des particules virales et bloque le relargage de ces particules à partir de la surface de la cellule. La protéine accessoire Vpu délocalise Tetherin/BST-2 et l'exclut des zones de bourgeonnement du virus, empêchant ainsi son incorporation dans les particules virales [2].

Nef est une des protéines accessoires du VIH. Elle est associée à la face interne de la membrane plasmique. Nef ne possède pas d'activité enzymatique mais exerce de multiples fonctions (pour une revue détaillée voir [3]). Ses fonctions principales sont liées à ses capacités d'interaction avec les machineries de trafic et de signalisation intracellulaire [4] (→). Un des premiers effets de Nef à avoir été décrit est la diminution de l'expression, à la surface cellulaire, de CD4, le récepteur du VIH, et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Il a ensuite été montré que Nef pouvait modifier l'expression membranaire de nombreuses protéines [3]. Une autre propriété importante de Nef, décrite il y a une vingtaine d'années, est sa capacité à augmenter l'infectivité des virions produits par la cellule infectée [3]. Le mécanisme d'action de Nef sur l'infectivité des particules virales est resté longtemps mal compris et de nombreuses équipes de recherche ont tenté d'identifier un potentiel facteur de

restriction impliqué. Grâce aux avancées des techniques de protéomique et transcriptomique à haut débit, trois équipes indépendantes sont récemment parvenues à identifier les protéines cellulaires cibles de Nef et impliquées dans la modulation de l'infectivité des virions : il s'agit des protéines *serine incorporator 3* et 5 (SERINC3 et SERINC5) [5-7].

#### Identification des nouveaux facteurs de restriction SERINC3 et SERINC5

La première équipe à l'origine de la découverte des facteurs de restriction cibles de Nef est partie de l'observation suivante : l'effet de Nef sur l'infectivité des virions produits varie en fonction de la cellule productrice. Les chercheurs ont donc établi le transcriptome de différentes lignées cellulaires présentant des sensibilités variables à l'effet de Nef sur l'infectivité [6] et ont mesuré les niveaux d'expression de nombreuses protéines cellulaires dans chacune de ces lignées. Cette méthode a permis d'identifier la protéine SERINC5, dont l'expression dans les différentes lignées corrèle le mieux avec l'effet de Nef [6].

(→) Voir la Synthèse de S. Bénichou et A. Benmerah, m/s n° 1, janvier 2003, page 100



La seconde équipe a utilisé une stratégie différente. Il avait été montré que l'activité de Nef sur l'infectivité des virions dépendait de la machinerie d'endocytose de la cellule productrice. Nef pourrait donc induire l'endocytose d'un facteur de restriction qui serait incorporé dans la particule virale et diminuerait l'infectivité. Une analyse protéomique des particules virales produites en présence ou en absence de Nef a donc permis d'identifier SERINC3 comme étant le facteur exclu de la particule virale par Nef pour augmenter l'infectivité [5].

La troisième équipe a réalisé une analyse globale de l'expression des protéines à la surface des cellules infectées soit par un virus sauvage (WT pour *wild type*) soit par un virus n'exprimant pas Nef. Cette impressionnante analyse protéomique différentielle a permis, là encore, d'identifier, entre autres, les protéines SERINC3 et SERINC5 présentes à la surface des cellules infectées par un virus délété de Nef [7].

### La famille des protéines SERINC

SERINC3 et SERINC5 font partie d'une famille de 7 protéines contenant 11 domaines transmembranaires [8, 9]. Leur principale fonction connue est de permettre l'incorporation de la sérine dans les lipides membranaires pour former la phosphatidylsérine ou des sphingolipides [10], composants essentiels des radeaux lipidiques<sup>1</sup>. Les protéines SERINC sont conservées au cours de l'évolution, y compris chez la levure, qui exprime une protéine partageant respectivement 30 % et 25 % d'homologie avec SERINC3 et SERINC5. Elles sont présentes de manière ubiquitaire mais leur expression peut également être induite, par exemple dans le cerveau par l'activation des neurones ou dans certaines tumeurs [10, 11]. Les protéines SERINC3 et SERINC5 sont présentes dans les lym-

phocytes T CD4 et dans les cellules dendritiques, des cellules cibles du VIH [5, 6]. Dans des lignées lymphocytaires, elles sont retrouvées à la membrane plasmique. Contrairement à la plupart des autres facteurs de restriction, leur expression dans ces cellules n'est pas augmentée par l'interféron ou par un traitement induisant la production d'interféron, tel que le lipopolysaccharide.

### Mécanisme d'action des protéines SERINC3 et SERINC5 contre le VIH

Étant donné le peu d'études réalisées sur les protéines SERINC, le mécanisme de restriction de l'infectivité des particules virales par ces protéines reste à éclaircir. Deux équipes [5, 6] se sont déjà intéressées à l'étape du cycle de réplication inhibée par la présence de SERINC5 dans la particule virale. La restriction a lieu à une étape très précoce, avant la transcription inverse de l'ARN viral. La présence de Nef dans la cellule productrice pourrait agir sur l'étape de fusion des particules virales à la membrane de la cellule cible. Les deux études concluent que, lorsque la quantité de SERINC5 dans la particule virale augmente, la fusion de ces virions avec la cellule cible est inhibée. Les auteurs proposent que SERINC5 agisse après la formation d'un pore de fusion entre la particule virale et la cellule cible en empêchant l'agrandissement de ce pore. Ce pore de fusion ne serait alors pas suffisamment grand pour permettre à la capsid virale de pénétrer le cytoplasme. L'étape d'agrandissement du pore au cours de la fusion est connue pour dépendre de la composition lipidique des membranes [12]. Le mécanisme d'action précis de SERINC5 dans cette étape reste cependant à préciser.

### Nef élimine SERINC3 et SERINC5 de la particule virale

Comment Nef antagonise-t-elle l'effet antiviral des protéines SERINC ? Comme discuté précédemment, les niveaux des protéines SERINC3 et SERINC5 à la membrane plasmique sont diminués par Nef

[5-7]. Nef agit en délocalisant les protéines SERINC5 vers les endosomes tardifs<sup>2</sup>, l'excluant ainsi de la plateforme de bourgeonnement viral à la membrane plasmique. De façon intéressante, l'effet antiviral de SERINC5 dépend de la glycoprotéine d'enveloppe virale. Si l'on crée des particules de VIH porteurs des glycoprotéines d'enveloppe du virus Ébola ou du VSV (*vesicular stomatitis virus*), celles-ci ne sont pas sensibles à la restriction par SERINC3 et SERINC5 [5, 6]. SERINC5 est bien incorporé dans ces particules virales mais ne diminue par leur infectivité. De plus, certaines glycoprotéines d'enveloppe du VIH permettent, elles aussi, d'échapper à l'effet antiviral de SERINC5. Il semble que la susceptibilité du VIH à la présence de Nef, et donc à l'effet négatif de SERINC5, puisse être liée à la stabilité de ses trimères d'enveloppe [13].

### Conclusion

L'identification des protéines SERINC3 et SERINC5 permet de mieux comprendre les effets de la protéine Nef lors de l'infection par le VIH. Cependant, de nombreuses questions restent encore à résoudre. Le rôle physiologique de SERINC3 et SERINC5 est peu caractérisé. Si ces protéines facilitent l'apport de sérine dans les voies de biosynthèse de phosphatidylsérine et des sphingolipides, quel est l'intérêt pour le virus de manipuler cette voie ? La composition lipidique des membranes virales peut être différente de celles des membranes cellulaires [14, 15] et la modification de leur contenu lipidique modifie très certainement leur capacité fusogène. Nef semble pouvoir directement modifier cette composition lipidique [16]. Il reste à déterminer si cette modification dépend des protéines SERINC3 et SERINC5. Une autre question concerne la présence physique des protéines SERINC3 et SERINC5 dans les virions.

<sup>1</sup> Un radeau lipidique ou raft lipidique est un microdomaine de la membrane plasmique, riche en sphingolipides, constituant un site privilégié pour l'activité de certaines protéines.

<sup>2</sup> Compartiment intracellulaire, exprimant la protéine Rab7 (protéine G impliquée dans l'endocytose et le transport vésiculaire), appartenant à la voie de dégradation des protéines.

Exercent-elles un effet antiviral local direct dans les virions en modifiant la qualité ou l'accessibilité des glycoprotéines d'enveloppe en plus de leur rôle sur les voies de biosynthèse des lipides ? Quel est le rôle physiologique des autres protéines de la famille SERINC ? Par ailleurs, l'expérience nous montre que les facteurs de restriction initialement identifiés contre le VIH agissent aussi contre d'autres espèces virales. L'identification des protéines SERINC3 et SERINC5 ouvre donc la voie à un nouveau champ d'investigations. ♦

### A mystery solved : HIV-1 Nef targets SERINC3 and SERINC5

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article

## RÉFÉRENCES

- Schwartz O. VIH-1 : un virus très Vif! *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 139-41.
- Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008 ; 451 : 425-30.
- Basmaciogullari S, Pizzato M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Front Microbiol* 2014 ; 5 : 232.
- Bénichou S, Benmerah A. Protéines Nef du VIH et K3/K5 du virus associé au sarcoma de Kaposi : des parasites de la voie d'endocytose. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 100-6.
- Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 2015 ; 526 : 218-23.
- Rosa A, Chande A, Ziglio S, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 2015 ; 526 : 212-7.
- Matheson NJ, Sumner J, Wals K, et al. Cell surface proteomic map of HIV infection reveals antagonism of amino acid metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host Microbe* 2015 ; 18 : 409-23.
- Grossman TR, Luque JM, Nelson N. Identification of a ubiquitous family of membrane proteins and their expression in mouse brain. *J Exp Biol* 2000 ; 203 : 447-57.
- Xu J, Ji C, Wang L, et al. Cloning and expression of a novel human C5orf12 gene, a member of the TMS-TDE family. *Mol Biol Rep* 2003 ; 30 : 47-52.
- Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T. Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 35776-83.
- Bossolasco M, Lebel M, Lemieux N, Mes-Masson AM. The human TDE gene homologue: localization to 20q13.1-13.3 and variable expression in human tumor cell lines and tissue. *Mol Carcinog* 1999 ; 26 : 189-200.
- Waheed AA, Freed EO. The role of lipids in retrovirus replication. *Viruses* 2010 ; 2 : 1146-80.
- Usami Y, Gottlinger H. HIV-1 Nef responsiveness is determined by Env variable regions involved in trimer association and correlates with neutralization sensitivity. *Cell Rep* 2013 ; 5 : 802-12.
- Cohen FS, Melikyan GB. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol* 2004 ; 199 : 1-14.
- Brugger B, Glass B, Haberkant P, et al. The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 2641-6.
- Brugger B, Krautkrämer E, Tibroni N, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology* 2007 ; 4 : 70.

## NOUVELLE

### Dissémination locale du cancer de la prostate Un chemin pavé de gras

Victor Laurent<sup>1</sup>, Adrien Guérard<sup>1</sup>, Aurélie Toulet<sup>1</sup>, Philippe Valet<sup>2</sup>, Bernard Malavaud<sup>3</sup>, Catherine Muller<sup>1</sup>

#### Le pronostic du cancer de la prostate est aggravé par l'obésité

Malgré les progrès réalisés en termes de dépistage, de diagnostic et de traitement, le cancer de la prostate demeure, chez l'homme, le cancer le plus fréquent et occupe la deuxième place en termes de mortalité dans les pays développés. L'identification des facteurs de risques de développement de cette maladie, ainsi que des mécanismes impliqués, est un enjeu majeur dans la prise en charge de cette pathologie. La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial ces 30 dernières années et, si l'obésité n'augmente pas l'incidence du cancer de la prostate, elle est associée à l'apparition de cancers agressifs présentant une augmentation de la

dissémination locale et à distance [1]. Comment expliquer ce lien ? Dans un contexte d'obésité, l'accumulation de tissu grasseux, en particulier au niveau viscéral, s'accompagne d'une modification du taux circulant de nombreuses molécules biologiquement actives sécrétées par le tissu adipeux (TA). Ces molécules, appelées adipokines et dont font partie la leptine, l'adiponectine et certaines molécules pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL6) [2], sont susceptibles d'affecter le comportement des tumeurs [3] (→).

Dans le cancer de la prostate, aucune étude clinique robuste n'a associé les taux circulants de ces adipokines

(→) Voir la Synthèse de V. Laurent et al., *m/s* n° 4, avril 2014, page 398

<sup>1</sup> Institut de pharmacologie et de biologie structurale (IPBS), université de Toulouse, CNRS, UPS, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse, France ;

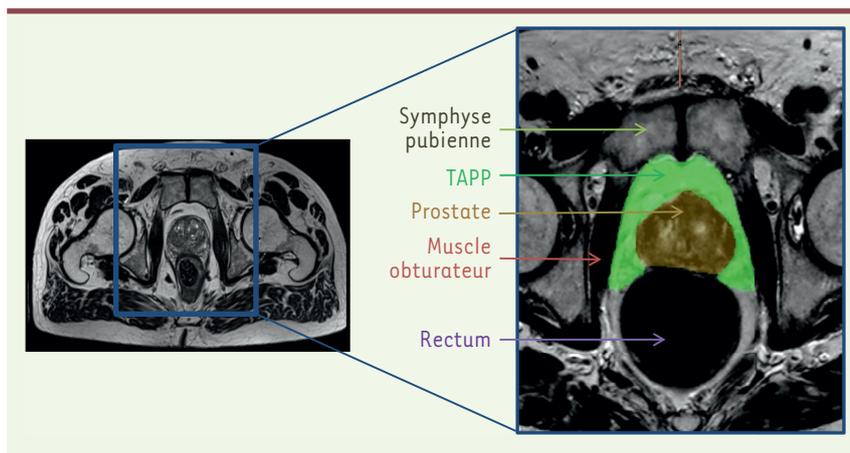
<sup>2</sup> Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), université de Toulouse, Inserm, UPS, 1, avenue Jean Poulhès, 31077 Toulouse, France ;

<sup>3</sup> Département d'urologie, institut universitaire du cancer, avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex 9, France. [muller@ipbs.fr](mailto:muller@ipbs.fr)

à l'apparition de cancers agressifs. Le mécanisme impliqué pourrait donc être de nature paracrine plus qu'endocrine. Ainsi, nos travaux associés à ceux d'autres équipes ont montré, en particulier dans le cancer du sein, le rôle déterminant que joue le tissu adipeux à proximité des tumeurs dans la progression tumorale (pour revue voir [3]). Si la proximité entre la tumeur et le TA est évidente dans le sein, qu'en est-il pour la prostate ?

#### La prostate : une glande dans un « îlot » grasseux

La prostate est entourée d'un dépôt grasseux appelé tissu adipeux périprostatique (TAPP), que l'on peut aisément



**Figure 1. La prostate est entourée d'un dépôt graisseux : le tissu adipeux périprostatique.** L'étude de l'anatomie de la prostate et des tissus environnants peut se faire par imagerie en résonance magnétique sur des coupes axiales. Sur cette coupe, on peut identifier un organe central : la prostate (zone jaune). Cet organe est entouré d'autres tissus, composés majoritairement par un dépôt adipeux, appelé tissu adipeux périprostatique (TAPP) (zone verte). Ce TAPP est limité par la symphyse pubienne en avant, le rectum en arrière et les muscles obturateurs latéralement. La prostate et le TAPP sont facilement identifiables en imagerie, grâce à leurs coefficients d'atténuations différents qui permettent d'obtenir un signal propre à chacun de ces deux tissus.

visualiser par imagerie (Figure 1). Ce tissu adipeux est classé comme un tissu adipeux viscéral (TAV) bien que très peu d'études aient réellement caractérisé ses capacités fonctionnelles et sécrétoires. Cliniquement, l'infiltration du TAPP par les cellules cancéreuses est considérée comme un facteur de mauvais pronostic [4] et des études cliniques émergentes suggèrent qu'il pourrait exister un lien entre l'abondance du TAPP et l'agressivité du cancer de la prostate [5]. Ces études, bien que préliminaires, renforcent l'idée d'un rôle paracrine du TAPP dans la progression du cancer de la prostate, rôle qui pourrait être amplifié dans un contexte d'obésité. Les sécrétions du TAPP semblent avoir un effet sur le comportement des cellules prostatiques en stimulant leur prolifération ainsi que leurs capacités migratoires et invasives et cet effet est régulé par l'obésité [6]. De façon très intéressante, cet effet est moins prononcé pour les sécrétions du TAV que celles du TAPP suggérant, pour ce dernier, un profil de sécrétion spécifique. Parmi les acteurs impliqués dans cet effet, on retrouve

principalement l'IL6 et les métalloprotéases<sup>1</sup> 2 et 9 [6]. Les sécrétions du TAPP pourraient donc influencer les propriétés invasives des cellules tumorales bien que ce concept n'ait pas été validé *in vivo*. Dans ce contexte, nous avons émis une hypothèse originale sur le rôle du TAPP. En effet, il est connu que le TA, et en particulier les adipocytes, sécrètent des chimiokines, petites molécules capables de stimuler la migration dirigée de nombreuses cellules [2]. La sécrétion de certaines chimiokines est augmentée dans l'obésité et participe à l'état sub-inflammatoire du TA en permettant le recrutement de cellules du système immunitaire [7]. Les récepteurs à chimiokines étant exprimés par les cellules cancéreuses [8], ce mécanisme pourrait expliquer comment le TAPP favorise une étape clé dans le cancer de la prostate, le franchissement de la capsule prostatique et donc l'envahissement local de la tumeur, l'obésité favorisant ce processus.

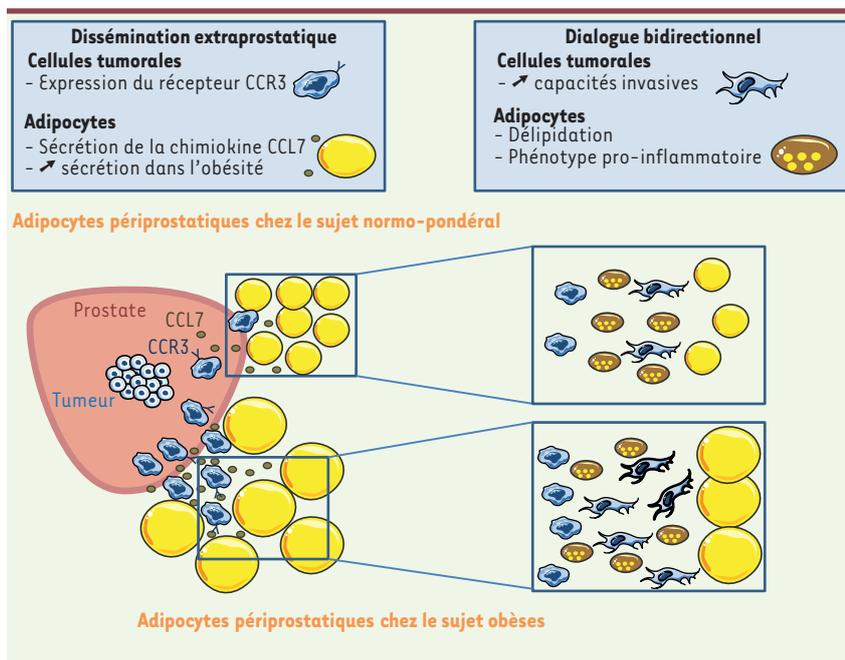
<sup>1</sup> Famille d'enzyme de la classe des peptidases dont le nom vient de la présence d'un ion métallique dans leur site actif.

### L'axe CCR3/CCL7 est déterminant pour la dissémination locale du cancer de la prostate dans un contexte d'obésité

Dans un premier temps, nous avons montré qu'*in vitro*, les sécrétions adipocytaires sont capables de favoriser la migration dirigée de lignées de cancer de la prostate et que cet effet est amplifié par l'obésité. Cette migration dirigée dépend de l'axe CCR3 (chemokine [C-C motif] receptor 3), exprimé par les cellules prostatiques, et son ligand CCL7/MCP3 (chemokine [C-C motif] ligand 7, aussi appelé monocyte-specific chemokine 3) sécrété par les adipocytes. *In vitro*, l'effet de l'obésité est totalement aboli par des anticorps bloquants dirigés contre ces deux protéines. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*. En effet, l'injection en intra-prostatique de cellules tumorales n'exprimant plus CCR3 inhibe très fortement la progression tumorale, surtout chez les souris obèses, préservant le TAPP d'une infiltration tumorale. Enfin, chez les patients, l'expression de CCR3 (régulée par l'obésité) est corrélée à l'apparition de tumeurs agressives présentant une extension locale, et est associée à une résistance au traitement chirurgical et à une rechute biologique plus précoce [9]. Ce travail confirme ainsi que l'infiltration des cellules cancéreuses prostatiques dans le TAPP environnant est sous le contrôle des sécrétions de ce dernier et que cet effet est amplifié dans l'obésité.

### Conclusions et perspectives

Ce travail met en exergue un nouveau rôle du tissu adipeux dans la progression tumorale. Ce mécanisme, impliquant la migration dirigée dans l'envahissement local, pourrait être étendu à d'autres tumeurs qui présentent un TA de proximité, comme par exemple le cancer du sein, du côlon, du pancréas ou le mélanome. Il est intéressant de signaler que l'axe CCR3/CCL7 semble spécifique du cancer de la prostate [9] et que, si les adipocytes sont effectivement capables d'attirer de très nombreux



**Figure 2. Rôle paracrine des adipocytes périprostatiques dans la dissémination locale du cancer de la prostate.** Les adipocytes du TAPP sécrètent la chimiokine CCL7 qui va diffuser au travers de la capsule prostatique jusqu'à la tumeur. L'interaction de CCL7 avec son récepteur CCR3 exprimé à la surface des cellules tumorales va permettre la migration de ces dernières en dehors de la glande prostatique. Les adipocytes hypertrophiques sécrètent en plus grande quantité la chimiokine CCL7, aboutissant à une augmentation du chimiotactisme dépendant des adipocytes. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi la dissémination extraprostatique est plus élevée chez le sujet obèse. Dans un second temps, après l'infiltration du TAPP par les cellules tumorales, un dialogue bidirectionnel entre les deux populations va se mettre en place. Sous l'influence des cellules tumorales,

le phénotype des adipocytes est profondément remanié. Ces derniers vont notamment présenter une délipidation importante et une sécrétion accrue de molécules pro-inflammatoires. Ces modifications vont avoir pour conséquence d'augmenter en retour les capacités invasives des cellules cancéreuses. CCL7 : chimiokine (C-C motif) ligand 7 ; CCR3 : chimiokine (C-C motif) receptor 3 ; TAPP : tissu adipeux périprostatique.

types de cellules tumorales, les couples récepteurs à chimiokines/chimiokines impliqués restent à identifier et pourraient être différents pour chaque type de tumeur. Dans le cancer de la prostate, l'inhibition de CCR3 pourrait présenter un intérêt thérapeutique. En effet, bloquer l'infiltration du TAPP est d'autant plus important qu'une fois les cellules cancéreuses présentes dans le TA, un dialogue bidirectionnel s'installe entre celles-ci et les adipocytes, favorisant ainsi l'invasion tumorale (et donc le processus métastatique) via la capacité des adipocytes à (1) sécréter des molécules pro-inflammatoires, (2) sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, (3) remodeler la matrice extracellulaire, mais également (4) modifier le métabolisme des cellules tumorales (pour revue voir [3]) (Figure 2). Notre étude est une des premières à montrer le rôle de CCR3 dans le cancer. Jusqu'alors, ce récepteur, fortement exprimé par les polynucléaires éosinophiles et basophiles, a surtout été impliqué dans des maladies

inflammatoires allergiques telles que l'asthme [10]. Des inhibiteurs de CCR3 étant en cours de développement dans cette indication, leur efficacité dans le cancer de la prostate, en particulier chez le sujet obèse, serait intéressante à évaluer. ♦

### Dissemination of prostate cancer: a way paved of fat

#### REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés dans nos équipes ont bénéficié du soutien financier de l'INCA (INCA PL 2010-214, PV et CM), de la Ligue Régionale Midi-Pyrénées Contre le Cancer (CM), de la Fondation de France (PV et CM) et de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Prostatiques ARTP (CM). Victor Laurent a bénéficié d'une bourse de thèse de l'ARC.

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Parker AS, Thiel DD, Bergstralh E, et al. Obese men have more advanced and more aggressive prostate cancer at time of surgery than non-obese men after adjusting for screening PSA level and age: results from two independent nested case-control studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013 ; 16 : 352-6.

2. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011 ; 11 : 85-97.
3. Laurent V, Nieto L, Valet P, Muller C. Tissu adipeux et cancer. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 398-404.
4. Kapoor J, Namdarian B, Pedersen J, et al. Extraprostatic extension into periprostatic fat is a more important determinant of prostate cancer recurrence than an invasive phenotype. *J Urol* 2013 ; 190 : 2061-6.
5. van Roermund JG, Hinnen KA, Tolman CJ, et al. Periprostatic fat correlates with tumour aggressiveness in prostate cancer patients. *BJU Int* 2011 ; 107 : 1775-9.
6. Ribeiro R, Monteiro C, Cunha V, et al. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res* 2012 ; 31 : 32.
7. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Biomolecules* 2015 ; 5 : 1563-79.
8. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 540-50.
9. Laurent V, Guérard A, Mazerolles C, et al. Periprostatic adipocytes act as a driving force for prostate cancer progression in obesity. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 10230.
10. Garcia G, Godot V, Humbert M. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005 ; 5 : 155-60.

## Hépatite C, EGFR, cirrhose et nétrine-1

### Intérêt en hépatocarcinogénèse?

Marie-Laure Plissonnier, Thomas Lahlali, Patrick Mehlen, Romain Parent

Centre de recherche en cancérologie de Lyon, 151, cours Albert Thomas, 69424 Lyon, France.  
romain.parent@inserm.fr



> Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus enveloppé comprenant un génome à ARN inclus dans une capsid protéique et entouré d'une bicouche lipidique contenant deux glycoprotéines. Chez les individus infectés, le virus persiste habituellement sous la forme d'une infection chronique du foie. Il est ainsi à l'origine d'un processus inflammatoire au long cours et, éventuellement, du développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC). Ceci survient la plupart du temps chez des patients atteints de cirrhose. Les traitements antiviraux à action directe ont beaucoup évolué récemment (avec entre autres molécules le sofosbuvir associé ou non au daclatasvir). Cependant, la manière dont le VHC influe sur le phénotype hépatocytaire pour permettre sa propre persistance reste le sujet de nombreuses questions qui ne sont toujours pas résolues.

Le virus de l'hépatite C se réplique principalement dans les hépatocytes dans lesquels il pénètre par des interactions complexes reposant sur plusieurs protéines de surface comme CD81 (ou *tetraspanin-28*), SRB1 (*scavenger receptor class B type 1*), certaines protéines de jonction serrée et le récepteur à l'EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*). Dans la cellule, le virus se réplique au niveau de membranes intracellulaires, en particulier celles dérivées du réticulum endoplasmique (RE).

Nous avons montré que la nétrine-1, une molécule chimiotropique, est étroitement impliquée dans le cycle de vie du virus *via* l'EGFR [1]. Ce rôle de la nétrine-1 en virologie est nouveau. En

effet, initialement décrite en embryogénèse comme un modulateur de la croissance axonale [2, 3] (→) la nétrine-1 a été impliquée, pour son rôle délétère, dans des processus inflammatoires gastrointestinaux [4], ainsi qu'en oncologie générale, tant dans des tissus épithéliaux que neuronaux [5-7].

La nétrine-1 favorise l'entrée du virus dans les cellules hépatiques en bloquant l'internalisation de l'EGFR, augmentant ainsi la présence de ce récepteur nécessaire à son adsorption, à la surface de la cellule. L'expression de la nétrine-1, qui est augmentée par le virus, conduit à son tour à une augmentation à la fois de la quantité de génome de l'ARN viral mais aussi du pouvoir infectieux des particules virales produites.

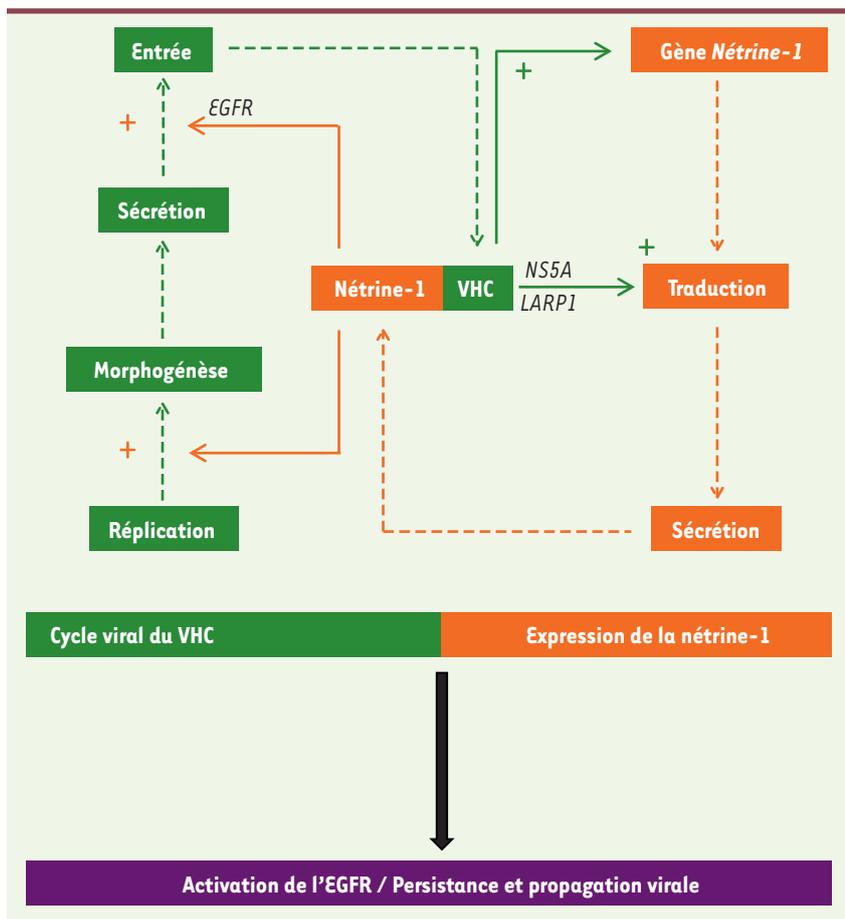
Nous avons mesuré la quantité de nétrine-1 dans des échantillons de biopsies de foie de patients infectés par le virus comparés à des prélèvements histologiquement similaires réalisés chez des patients non infectés par le VHC, ni par le virus de l'hépatite B. Une augmentation substantielle (> 20 fois) de la quantité de transcrite de nétrine-1 a été observée dans les échantillons provenant des patients infectés. Le traitement de ces patients avec des médicaments antiviraux, le plus souvent une bithérapie basée sur l'interféron alpha et la ribavirine, permet de réverser cette augmentation. *In vitro*, l'infection par le VHC d'hépatocytes humains primaires et d'une lignée de cellules hépatocytaires (Huh7.5) conduit également à une aug-

mentation importante de la quantité d'ARNm de la nétrine-1, ainsi qu'à une traduction accrue de ce transcrite.

Bien que son importance fonctionnelle soit peu claire, une interaction entre le transcrite de la nétrine-1 et la protéine liant l'ARN, LARP1 (*La-related protein 1*), a été décrite [8]. Nous avons constaté que LARP1 interagissait également spécifiquement avec l'une des protéines non structurales du VHC, NS5A (*nonstructural protein 5A*), au niveau des membranes du RE où elle favorise la traduction de la nétrine-1. Dans les cellules infectées, NS5A contribue à la relocalisation de LARP1 et du transcrite de nétrine-1 qui lui est associé, dans des zones du RE traductionnellement actives. Dans des expériences de surexpression et de knock-down du transcrite *nétrine-1*, nous avons montré que la quantité de transcrite de la protéine était corrélée à celle d'ARN du VHC produit et au pouvoir infectieux des particules virales produites. L'infection par le VHC favorise donc la traduction de nétrine-1 qui, à son tour, favorise l'infectivité du virus. La nétrine-1 augmente également le niveau global d'EGFR à la surface des cellules et de sa forme activée (c'est-à-dire phosphorylée) en entravant son internalisation, cet événement moléculaire concourant à l'entrée du virus dans les cellules.

Une telle boucle de rétroaction positive (résumée dans la *Figure 1*) est rarement observée dans les systèmes biologiques. Elle pourrait expliquer comment l'infection par le virus peut favoriser une certaine résistance à la mort cellulaire des cellules du foie infectées par le VHC.

(→) Voir la Synthèse de P. Mehlen et N. Rama, *m/s* n° 3, mars 2007, page 311



**Figure 1. Amplification mutuelle du virus de l'hépatite C et de la nétrine-1.** Le virus de l'hépatite C induit la relocalisation de la protéine LARP1 sur des sites actifs de traduction par expression de sa protéine NS5A, favorisant ainsi l'expression de la nétrine-1. La nétrine-1 facilite en retour l'entrée virale par activation quantitative et qualitative du récepteur de l'EGF à la membrane plasmique de la cellule hôte. Les modalités par lesquelles l'induction transcriptionnelle du transcrite nétrine-1 et l'activation de la morphogénèse virale ont lieu ne sont pas identifiées. EGF : epidermal growth factor ; EGFR : récepteur de l'EGF ; LARP1 : La-related protein 1 ; NS5A : nonstructural protein 5A ; VHC : virus de l'hépatite C.

Cette résistance potentielle, induite par la nétrine-1, pourrait ainsi participer au processus de cancérisation au stade cirrhotique, où les taux de nétrine sont les plus élevés, en s'ajoutant au caractère directement oncogène de certaines protéines virales comme la capsid et NS5A [9]. L'effondrement des taux de nétrine-1 entre les stades cirrhotique et CHC que nous avons observé, semble suggérer que la protéine exercerait son pouvoir oncogène éventuel à un stade initial de la maladie, la tumeur s'émancipant ensuite du système des récepteurs à dépendance pour son évolution ultérieure.

Cette hypothèse reste cependant à démontrer et demande une confirmation expérimentale. En effet, l'expression de la nétrine-1 ne confère pas un avantage de survie aux cellules cultivées que nous avons utilisées dans cette étude. Cependant, dans une autre étude, nous avons montré qu'elle déterminait une survie hépatocytaire accrue lors de l'induction expérimentale de la réponse aux protéines mal repliées (appelée UPR en anglais, *unfolded protein response*), une caractéristique commune à de nombreuses maladies chroniques du foie [10]. De

plus, compte tenu de la fréquence de dysrégulation de la voie de l'EGFR que l'observe à un stade avancé de la maladie hépatique chronique [11], l'association fonctionnelle entre nétrine-1 et EGFR pourrait être potentiellement importante pour l'apparition du carcinome hépatocellulaire.

Nous avons donc montré que la nétrine-1 pouvait constituer une cible potentielle en hépatologie et, en premier lieu, contre le VHC chez les patients cirrhotiques. La nétrine-1 est actuellement évaluée dans des essais de phase 1 en oncologie générale au Centre de lutte contre le cancer Léon Bérard de Lyon. Son implication possible, mais qui reste à être démontrée, dans le développement du CHC, renforce son intérêt thérapeutique potentiel chez les 5 à 15 % de patients cirrhotiques infectés par ce virus et en échec thérapeutique, malgré les dernières avancées antivirales. [12]. ♦

### Hepatitis C, EGFR, cirrhosis and netrin-1: potential implications for HCC onset

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions la société Plume Scientific Communication Services pour leur apport rédactionnel sur la version initiale de cet article.

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

- 1 Plissonnier ML, Lahlali T, Michelet M, et al. Epidermal growth factor receptor-dependent mutual amplification between netrin-1 and the hepatitis C virus. *PLoS Biol* 2016 ; 14 : e1002421.
- 2 Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, et al. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2B receptor. *Nature* 2000 ; 407 : 747-50.
- 3 Mehlen P, Rama N. Nétrine-1 et guidage axonal : signalisation et traduction asymétrique. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 311-6.
- 4 Paradisi A, Maisse C, Bernet A, et al. NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology* 2008 ; 135 : 1248-57.
- 5 Castets M, Broutier L, Molin Y, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* 2011 ; 482 : 534-7.
- 6 Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 2004 ; 431 : 80-4.



## RÉFÉRENCES

- 7 Delloye-Bourgeois C, Fitamant J, Paradisi A, et al. Netrin-1 acts as a survival factor for aggressive neuroblastoma. *J Exp Med* 2009 ; 206 : 833-47.
- 8 Mura M, Hopkins TG, Michael T, et al. LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene* 2015 ; 34 : 5025-36.

- 9 Mitchell JK, Lemon SM, McGivern DR. How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer? *Curr Opin Virol* 2015 ; 14 : 101-8.
- 10 Lahlali T, Michelet M, Zoulim F, et al. Netrin-1 protects against hepatocytic cell death through sustained translation during the unfolded protein response. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 2 : 281-301.e9.

- 11 Berasain C, Avila MA. The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol* 2014 ; 49 : 9-23.
- 12 Zoulim F, Liang TJ, Gerbes AL, et al. Hepatitis C virus treatment in the real world: optimising treatment and access to therapies. *Gut* 2015 ; 64 : 1824-33.

## NOUVELLE

### Implication de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans le contrôle de la neurogenèse corticale

Sophie Laguesse<sup>1,2</sup>, Catherine Creppe<sup>1,2</sup>, Juliette D. Godin<sup>3</sup>, Laurent Nguyen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>GIGA-Neurosciences, université de Liège, CHU Sart Tilman, Avenue de l'Hopital, 1, Liège 4020, Belgique ;

<sup>2</sup>Interdisciplinary cluster for applied genoproteomics (GIGA-R), université de Liège, CHU Sart Tilman, Liège 4000, Belgique ;

<sup>3</sup>Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC), Inserm U964, CNRS UMR7104, université de Strasbourg, Illkirch, France. [sophie.laguesse@ucsf.edu](mailto:sophie.laguesse@ucsf.edu)

#### Le développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral est la couche de matière grise qui recouvre les hémisphères cérébraux. Il est le siège des fonctions neurologiques élaborées comme le mouvement volontaire, le traitement des informations sensorielles, l'apprentissage ou encore la mémoire. Au cours de la corticogenèse, les progéniteurs neuronaux prolifèrent puis se différencient pour produire des neurones. Dans le cortex cérébral des rongeurs, on distingue essentiellement deux types de progéniteurs selon leur morphologie, l'expression de marqueurs moléculaires et leur mode de division : les progéniteurs apicaux (PA) et les progéniteurs intermédiaires (PI) [1]. Les premiers jours du développement cortical sont marqués par des étapes d'amplification des PA, au cours desquelles la majorité de ces progéniteurs se divisent au niveau de la surface apicale pour donner naissance à deux nouveaux PA. On parle alors de divisions « prolifératrices ». Plus tard au cours du développement, le mode de division des PA change. Grâce à des divisions dites « neurogéniques », un PA génère alors un nouveau PA ainsi qu'un autre type cellulaire différencié. Cette nouvelle cellule différenciée est soit un neurone soit un PI. Les PI se divisent ensuite à distance de la surface apicale et la plupart d'entre eux donnent naissance à

deux neurones. La production de neurones directement à partir de PA est appelée neurogenèse directe. La neurogenèse indirecte, elle, implique l'étape intermédiaire des PI et permet d'accroître le nombre de neurones produits par unité de temps et de surface [2] (Figure 1).

#### Le complexe Elongator

Elongator est un complexe macromoléculaire jouant un rôle critique dans la maturation des neurones de projection<sup>1</sup> [3, 4] (→).

Il est composé de deux copies de chacune de ses six sous-unités (E1p[Elongator complex protein]1 à E1p6). E1p1 est une protéine de structure essentielle à l'assemblage du complexe tandis qu'E1p3 est la sous-unité enzymatique présentant à la fois une activité d'acétyltransférase et de déméthylase [5, 6]. Le complexe Elongator est présent dans le noyau et dans le cytoplasme de tous les neurones corticaux ainsi que leurs progéniteurs, où il exerce différentes fonctions [7]. Une fonction cytoplasmique majeure de ce complexe est son implication dans la

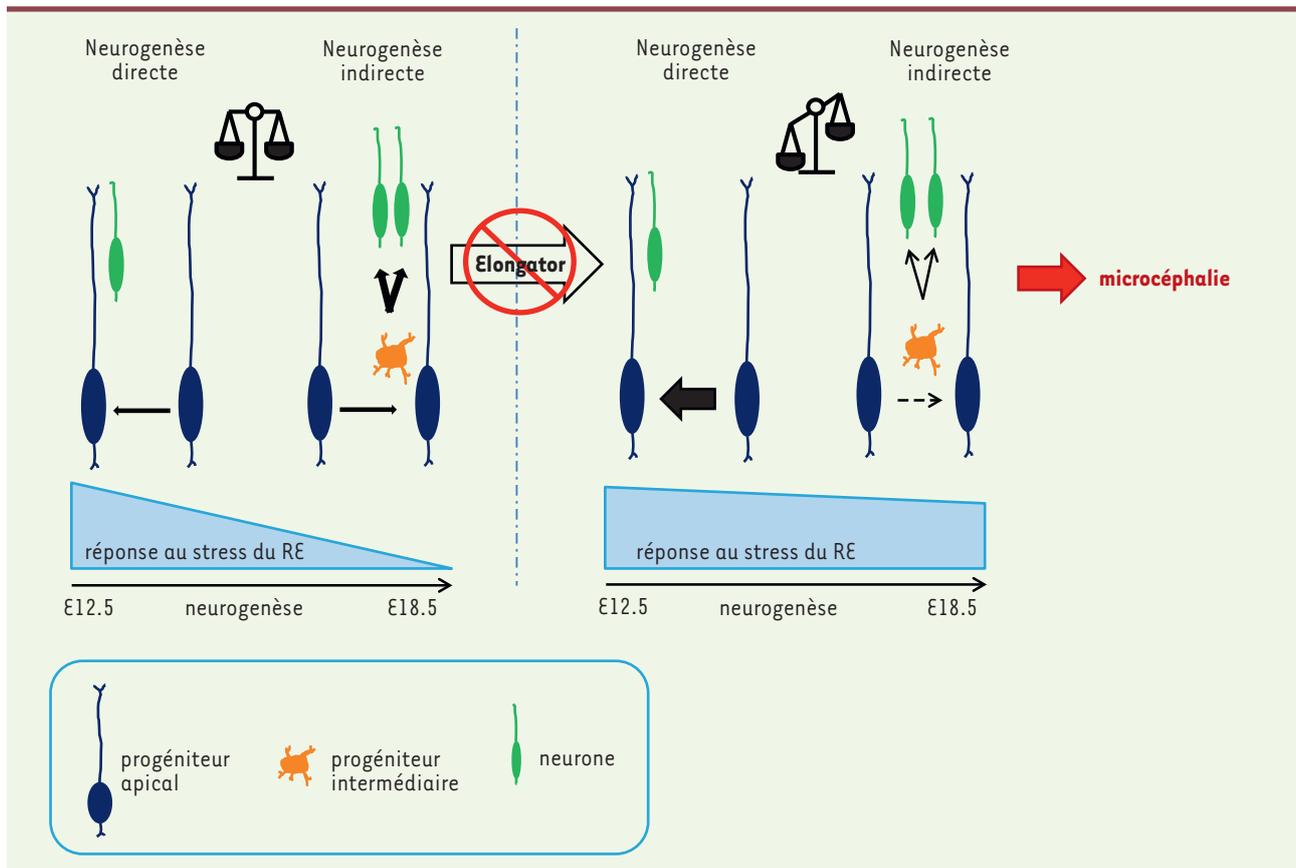
maturation de certains ARN de transfert (ARNt). Plus particulièrement, Elongator est requis pour l'ajout d'un groupement chimique 5-méthoxycarbonylméthyl (mcm5) sur l'uridine présente en position 34 (U<sub>34</sub>) de l'anticodon de certains ARNt. Cette modification est nécessaire pour assurer une traduction fidèle et efficace de l'ARNm en protéine [8].

#### Elongator contrôle l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte

Afin d'étudier le rôle d'Elongator au sein des progéniteurs corticaux, nous avons créé un modèle murin d'inactivation conditionnelle de la sous-unité E1p3. Pour cela, nous avons croisé des souris transgéniques où une partie de la séquence codante d'E1p3 est flanquée de sites « loxp<sup>2</sup> » (E1p3lox/lox) avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le promoteur de FoxG1, un gène exprimé par les progéniteurs de neurones corticaux (FoxG1Cre). Dans la lignée de souris transgéniques

<sup>1</sup> Neurones dont l'axone va se projeter vers une ou plusieurs structures cérébrales à distance.

<sup>2</sup> Le système de recombinaison Cre-lox utilise l'enzyme recombinase Cre, une tyrosine recombinase issue du bactériophage P1, afin de cibler des séquences loxp (également issues du bactériophage P1), permettant ainsi d'activer, réprimer, voire même échanger, les gènes situés entre les séquences lox.



**Figure 1. Modèle suggérant l'implication de l'UPR (réponse au stress du RE) dans le contrôle de la neurogenèse au cours du développement du cortex cérébral.** En conditions normales (à gauche), on observe une diminution progressive de l'UPR dans les progéniteurs apicaux (PA) qui coïncide avec l'apparition de la neurogenèse indirecte. L'invalidation d'Elp3 dans les PA (à droite) provoque un défaut de traduction protéique responsable de l'accumulation de protéines mal repliées et d'un stress accru du RE. On observe alors une activation excessive de l'UPR qui dérègle l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte, conduisant *in fine* à un nombre réduit de PI et à la microcéphalie. E12.5 : jour 12.5 de l'embryogenèse ; Elp3 : *Elongator complex protein 3* ; PI : progéniteurs indirects ; RE : réticulum endoplasmique ; UPR : *unfolded protein response*.

résultant de ce croisement (Elp3lox/lox;FoxG1Cre), Elp3 est ainsi invalidé de façon spécifique dans les progéniteurs neuronaux. Les souris déficientes en Elp3 présentent une microcéphalie<sup>3</sup> sévère, causée par une réduction du nombre de neurones affectant toutes les couches du cortex. Nous avons analysé plus en détail les causes de cette microcéphalie et identifié une diminution spécifique de la population des PI. Grâce à la technique d'électroporation *in utero*<sup>4</sup>, nous avons suivi le destin

cellulaire des PA et démontré que l'absence d'Elp3 induit une augmentation de la neurogenèse directe aux dépens de la neurogenèse indirecte, menant ainsi à un nombre réduit de neurones et à une microcéphalie. Afin d'étudier cette fonction d'Elongator dans la neurogenèse, nous avons utilisé des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) pour modéliser la formation du tube neural en développement. Les cellules souches cultivées sur un tapis de cellules stromales<sup>5</sup> forment ainsi des rosettes neurales en bordure desquelles sont présentes des cellules qui possèdent des caractéristiques semblables aux

PA, tandis qu'on retrouve en périphérie des cellules plus différenciées, comparables aux PI. L'invalidation d'Elp3 dans les hESCs provoque une réduction du nombre de PI dans les rosettes, produisant un phénotype comparable à celui observé lors de la corticogenèse murine. Après avoir étudié l'influence d'Elp3, nous nous sommes tournés vers l'étude d'Elp1. Chez l'homme, la dysautonomie familiale [4] (→) est une maladie héréditaire causée par une mutation du gène codant pour la sous-unité Elp1 [9]. Nous avons donc investigué la composition des rosettes formées à partir de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) provenant de fibroblastes de

(→) Voir la Nouvelle de C. Creppe et al., m/s n° 2, février 2010, page 135

<sup>3</sup> Boîte crânienne de taille anormalement petite.

<sup>4</sup> Technique consistant à injecter un fragment d'ADN directement dans le ventricule cérébral du cerveau des embryons à l'aide d'une micropipette. L'ADN est ensuite incorporé dans les progéniteurs corticaux bordant la lumière ventriculaire grâce à l'application locale d'un champ électrique

<sup>5</sup> Cellules issues de la moelle osseuse et ayant des propriétés de cellules souches.



patients atteints de cette maladie. De même que pour les hESC déficientes en *Elp3*, nous avons observé, dans les rosettes déficientes en *Elp1*, une réduction de la production de PI par neurogenèse indirecte. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que l'expression et l'activité d'Elongator sont requises pour le maintien de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte, à la fois dans le cortex cérébral murin en développement et dans le tissu neural dérivé de cellules souches humaines.

### L'invalidation d'*Elp3* provoque un stress du réticulum endoplasmique (RE), accroît l'UPR (réponse au stress du RE) et induit un défaut de neurogenèse

L'importance du complexe Elongator dans la modification des ARNt a été démontrée dans plusieurs modèles eucaryotes [10]. Nos résultats ont confirmé son implication dans la modification de l'uridine en position 34 ( $U_{34}$ ) de certains ARNt au cours de la corticogenèse. En effet, en l'absence d'*Elp3*, les ribosomes marquent des pauses plus longues sur l'ARNm et ce spécifiquement sur les codons reconnus par les ARNt dont l' $U_{34}$  est normalement modifiée par l'ajout d'un groupement chimique de type mcm5. Cette observation suggère un défaut de décodage entre le codon et l'anti-codon pouvant conduire à des problèmes de traduction protéique. En effet, il a récemment été montré chez les levures et les nématodes que l'absence de modification sur l' $U_{34}$  est responsable non seulement d'un taux réduit de traduction protéique, mais également d'une accumulation de protéines agrégées [11]. Par microscopie électronique, nous avons mis en évidence des signes de stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les PA des animaux invalidés pour *Elp3*, indiquant une accumulation de protéines mal repliées, dont le nombre important excède celui des chaperonnes<sup>6</sup> affectant leur bon

fonctionnement. La réponse cellulaire au stress du RE, appelée également UPR (*unfolded protein response*), peut se traduire par l'activation de plusieurs voies de signalisation permettant de lutter contre l'accumulation de protéines mal conformées afin de restaurer l'homéostasie cellulaire. Dans notre modèle, l'UPR se traduit par l'activation spécifique de la voie de signalisation régulée par PERK (*PKR[protein kinase RNA]-like endoplasmic reticulum kinase*), une protéine réceptrice du stress, présente dans la membrane du RE, qui active d'autres effecteurs dont *eIF2 $\alpha$*  (*eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit*) et ATF4 (*activating transcription factor 4*), et qui stimule notamment l'autophagie. L'analyse du cortex des animaux invalidés pour *Elp3* a en effet démontré la présence de nombreux autophagolysosomes<sup>7</sup> ainsi qu'une augmentation de l'expression d'*eIF2 $\alpha$*  et d'ATF4. Afin de déterminer si cette augmentation du stress du RE et sa transduction via l'UPR jouent un rôle dans les défauts de neurogenèse observés, nous avons bloqué la voie UPR incriminée en rétablissant les niveaux d'expression d'ATF4 dans le cortex d'embryons déficients en *Elp3*. Dans ces conditions, la production de PI par neurogenèse indirecte apparaît normale indiquant un rétablissement de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte. Inversement, l'induction pharmacologique d'un stress du RE dans le cortex d'embryons sauvages par injection de tunicamycine<sup>8</sup> provoque l'apparition de défauts de neurogenèse semblables à ceux observés en l'absence d'*Elp3*.

### La régulation dynamique de l'UPR est nécessaire au contrôle de la neurogenèse corticale

Nos résultats montrent l'importance d'un contrôle précis de l'équilibre entre les neurogenèses directe et indirecte au cours du développement du cortex

cérébral. L'invalidation d'Elongator dans les progéniteurs corticaux provoque des défauts de traduction protéique, causant un stress du RE accru et une suractivation de l'UPR qui conduit à un dérèglement de l'équilibre neurogénétique (Figure 1), induisant *in fine* une microcéphalie. De façon intéressante, en conditions physiologiques, nous avons observé, au cours du développement cortical, une diminution progressive de l'expression des effecteurs de l'UPR tels ATF4, ATF5 et CHOP (*C/EBP [CCAAT/enhancer binding protein] homologous protein*) qui coïncide avec la réduction progressive des divisions des PA par neurogenèse directe. De plus, l'invalidation d'ATF4 au début du développement cortical conduit à une réduction de la neurogenèse directe, mettant ainsi en évidence l'importance de l'UPR au cours de la neurogenèse. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent qu'une régulation dynamique des différentes composantes de l'UPR est nécessaire pour un contrôle précis de la neurogenèse corticale. ♦

### Unveiling the role of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cortical neurogenesis

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 ; 6 : 777-88.
2. Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 136-44.
3. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 2009 ; 136 : 551-64.
4. Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, et al. Elongator orchestrate la neurogenèse du cortex cérébral. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 135-7.
5. Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, et al. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 3517-22.
6. Okada Y, Yamagata K, Hong K, et al. A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* 2010 ; 463 : 554-8.

<sup>6</sup> Protéines permettant la maturation d'autres protéines, notamment leur repliement correct.

<sup>7</sup> Vacuoles d'autophagie.

<sup>8</sup> Antibiotique provoquant l'UPR.

## RÉFÉRENCES

7. Nguyen L, Humbert S, Saudou F, Chariot A. Elongator – an emerging role in neurological disorders. *Trends Mol Med* 2010 ; 16 : 1–6.
8. Grosjean H, de Crecy-Lagard V, Marck C. Deciphering synonymous codons in the three domains of life: co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 252–64.
9. Slauchaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, et al. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 598–605.
10. Karlsborn T, Tukenmez H, Mahmud AK, et al. Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in eukaryotes. *RNA Biol* 2014 ; 11 : 1519–28.
11. Nedialkova DD, Leidel SA. Optimization of codon translation rates via tRNA modifications maintains proteome integrity. *Cell* 2015 ; 161 : 1606–18.

## NOUVELLE

### Les mutations du gène **NONO** sont responsables d'un nouveau syndrome de déficience intellectuelle lié au dysfonctionnement des synapses inhibitrices

Maéva Langouët<sup>1</sup>, Dennis Mircsof<sup>2,3</sup>, Marlène Rio<sup>1</sup>, Jeanne Amiel<sup>1</sup>, Steven A. Brown<sup>2</sup>, Laurence Colleaux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR 1163, laboratoire bases moléculaires et pathophysiologiques des désordres cognitifs, université Paris Descartes– Sorbonne Paris Cité, institut *Imagine*, hôpital Necker–Enfants Malades, 24, boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France ;  
<sup>2</sup> Chronobiology and Sleep Research Group, Neuromorphology Group, Institute of Pharmacology, Inserm UMR 1163, Hôpital Necker Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France ;  
<sup>3</sup> Neuromorphology Group, Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Zurich, 190 Winterthurerstrasse, 8057 Zurich, Suisse.  
[maeva.langouet@gmail.com](mailto:maeva.langouet@gmail.com)  
[laurence.colleaux@inserm.fr](mailto:laurence.colleaux@inserm.fr)

Le terme déficience intellectuelle (DI) ne désigne pas une maladie unique mais un ensemble de pathologies extrêmement hétérogène ayant en commun un fonctionnement intellectuel général inférieur à la moyenne et des limitations du fonctionnement adaptatif<sup>1</sup> [13]. La prévalence de la DI est de 1 % si on ne considère que les DI sévères (quotient intellectuel [QI] inférieur à 50) et s'élève à 2-3 % si l'on inclut les DI légères (QI entre 50 et 70 [1]). De multiples causes, génétiques et environnementales, ont été recensées. Cependant, la grande majorité des DI légères et 40 % des DI sévères sont aujourd'hui encore inexplicables. Ces maladies neuro-développementales fréquentes et gravement invalidantes sont responsables de 10 % des dépenses de santé dans les pays développés, loin devant le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Il s'agit donc d'un enjeu scientifique et médical majeur [2] (→).

(→) Voir la Synthèse de S. Harel et S. Jenna, m/s n° 1, janvier 2011, page 70

Depuis 5 ans, la révolution génomique a conduit au développement de nouveaux outils de séquençage à très haut débit et de méthodes permettant de cibler des régions d'intérêt. De nombreuses applications médicales ont vu le jour depuis l'avènement de ces nouvelles techniques, qu'elles s'appuient sur l'analyse d'une sélection de gènes spécifiques ou le re-séquençage<sup>2</sup> de l'ensemble des régions codantes du génome humain (*whole exome sequencing* ou WES). Ces outils ont décuplé nos capacités à détecter des variations génétiques dans les gènes déjà associés à une maladie ou dans des gènes dont le rôle n'était pas suspecté, offrant une méthode de diagnostic efficace, rapide et économique des maladies rares. Dans le cadre des DI syndromiques<sup>3</sup>, elle permet ainsi d'identifier une cause génétique chez 50 % des patients [3].

### Identification d'un nouveau gène impliqué dans la déficience intellectuelle : **NONO/P54NRB**

En collaboration avec les médecins du département de génétique de l'hôpital Necker-Enfants malades, nous avons eu l'opportunité d'étudier deux patients non apparentés présentant un phénotype très semblable. Ce phénotype est caractérisé par l'association d'une mégalencéphalie<sup>4</sup>, d'un corps calleux<sup>5</sup> épais et d'une DI sévère et est désigné ci-après sous le nom de syndrome MCCDI (mégalencéphalie/corps calleux/DI). Ces patients souffrent également d'une hypoplasie malaire<sup>6</sup> importante accompagnée de troubles sévères de l'élocution. Afin d'identifier le défaut génétique sous-jacent, nous avons utilisé une approche de WES et analysé les données à la recherche de mutations touchant le même gène chez les deux patients. Cette analyse nous a permis d'identifier

<sup>1</sup> Capacité de s'adapter aux demandes et contraintes de l'environnement.

<sup>2</sup> Séquençage lorsque la séquence du génome de référence est déjà connue.

<sup>3</sup> Déficience intellectuelle associée à d'autres symptômes, physiques, neurologiques et/ou psychiatriques.

<sup>4</sup> Augmentation du volume du cerveau.

<sup>5</sup> Ensemble de fibres nerveuses reliant les deux hémisphères cérébraux.

<sup>6</sup> Développement insuffisant de l'os de la pommette.



2 mutations nulles<sup>7</sup> dans un gène lié au chromosome X : *NONO* (*non-POU domain-containing octamer-binding protein coding gene*)/*P54NRB*<sup>8</sup> [4]. Le rôle du gène *NONO* dans l'étiologie de la DI a ensuite été définitivement démontré par l'identification, au cours d'une étude britannique, d'un troisième patient porteur d'une nouvelle mutation de ce gène<sup>9</sup> et présentant des signes morphologiques et comportementaux très similaires aux deux patients MCCI décrits ci-dessus [5].

Avec *PSPC1* (*paraspeckle component 1*) et *SFPQ/PSF* (*splicing factor proline/glutamine-rich*), *NONO* appartient à la famille des protéines DBHS (*drosophila behaviour human splicing*). Ces trois protéines nucléaires forment des homo- ou hétéro- dimères et sont impliquées dans de nombreux processus liés à la synthèse et la régulation de l'expression des ARN messagers [6]. Des travaux menés sur un modèle murin inactivé pour ce gène (*Nono*<sup>gt</sup>) ont de plus suggéré un rôle de la protéine *NONO* dans la régulation du rythme circadien [7].

L'étude de fibroblastes primaires issus des patients MCCI a révélé que les deux mutations identifiées conduisaient à l'absence totale de protéine *NONO*. En accord avec l'implication de *NONO* dans la régulation de l'expression génique, nous avons mis en évidence une dérégulation globale de l'expression des gènes dans ces fibroblastes.

### Le modèle murin : fidèle reproduction des anomalies observées chez les patients

En collaboration avec l'équipe de Steven Brown (université de Zurich), nous avons repris l'analyse du modèle murin (*Nono*<sup>gt</sup>) pour évaluer sa pertinence au regard du phénotype observé chez les patients. Nous avons tout d'abord montré que le modèle murin mimait parfaitement plusieurs des signes cliniques observés chez les patients. En particulier, nous avons observé chez ces mutants des anomalies crânio-faciales et cérébrales similaires à celles présentes chez les patients. De même, la réalisation de divers tests comportementaux a confirmé l'existence d'anomalies cognitives et d'un comportement anxieux.

Enfin, l'analyse transcriptomique de fibroblastes embryonnaires (MEF, *mouse embryonic fibroblasts*) de souris mutantes et sauvages, suivie d'une méta-analyse des données obtenues chez les souris et chez l'homme, ont montré que des cellules issues de patients et de souris mutées présentaient la même dérégulation transcriptionnelle globale. Une analyse de *clustering* (regroupement) hiérarchique a révélé une séparation des échantillons en deux groupes, dépendants non pas de l'espèce mais du statut muté (patient) ou sauvage (sujet sain). Ce résultat suggère donc l'existence d'une signature transcriptomique *NONO*-dépendante.

L'ensemble de ces observations confirme l'intérêt de ce modèle murin *Nono*<sup>gt</sup> pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques responsables du syndrome MCCI, en particulier en étudiant le rôle de *NONO* au niveau du cerveau.

### *NONO* régule l'abondance des ARNm synaptiques

L'exploration du modèle murin a permis de mettre en évidence une expression importante de la protéine *NONO* dans les cerveaux des souris sauvages, en particulier au niveau des neurones. Les souris déficientes pour ce gène montrent une dérégulation majeure de l'expression

des ARNm localisés au niveau de la synapse, 30 % des transcrits étant altérés en l'absence de protéine *NONO*. Parmi les ARNm présentant, d'un point de vue quantitatif, l'anomalie la plus importante, figure le transcrite *Gabra2* codant la sous-unité  $\alpha 2$  du récepteur au GABA<sub>A</sub> (acide gamma-aminobutyrique). L'anomalie d'expression du gène *Gabra2* combinée au phénotype anxieux observé chez les souris *Nono*<sup>gt</sup> nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'absence de protéine *NONO* pourrait être responsable d'une anomalie structurelle ou fonctionnelle des synapses inhibitrices GABAergiques.

### Anomalie structurelle des synapses inhibitrices chez les souris *Nono*<sup>gt</sup> : un phénotype réversible *in vitro*

Pour tester cette hypothèse nous avons analysé par immunohistochimie l'intégrité de la structure des synapses inhibitrices chez des souris mutantes et sauvages. Alors que des marquages utilisant des anticorps dirigés contre un marqueur pré-synaptique, le transporteur vésiculaire du GABA (VGAT), ne montrent pas d'anomalie chez les souris mutantes, la diminution de l'expression de la sous-unité  $\alpha 2$  entraîne un nombre réduit de récepteurs au GABA<sub>A</sub> à la synapse, ainsi qu'un défaut de l'intégrité du réseau de géphyrine, la principale protéine de l'échafaudage post-synaptique inhibiteur (*Figure 1*) [8-11].

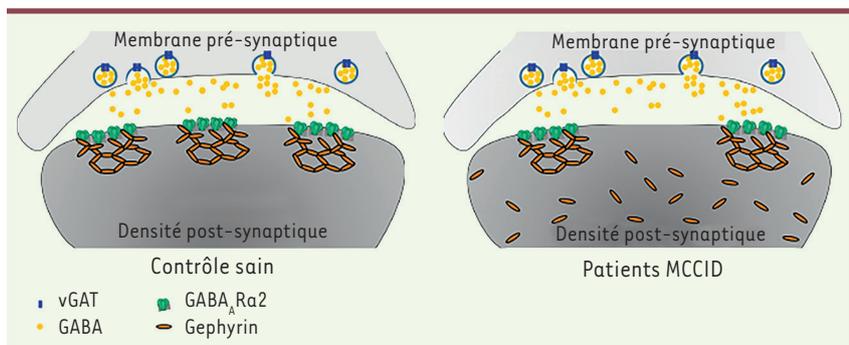
Enfin, en combinant des expériences de transfection de cultures primaires de neurones et des expériences d'injection stéréotaxique<sup>10</sup> d'adénovirus au niveau de l'hippocampe, nous avons démontré que cette anomalie structurelle des synapses inhibitrices pouvait être corrigée par la sur-expression du gène *Gabra2*. Ce résultat particulièrement intéressant et prometteur laisse donc entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques pour ces patients.

<sup>7</sup> Mutations rendant un gène non fonctionnel.

<sup>8</sup> Plus particulièrement, ces deux mutations sont : c.1131G>A (variation nucléotidique d'une Guanine vers une Adénine en position 1131 au niveau de la séquence de l'ADN complémentaire [ADNc]) ; p.Ala377Ala (variation d'un acide aminé Alanine vers le même acide aminé Alanine en position 377 au niveau de la séquence protéique) touchant une base essentielle à l'épissage et c.1394dup (duplication du nucléotide en position 1394 au niveau de la séquence de l'ADNc) ; p.Asn466Lysfs\*13 (variation d'un acide aminé Asparagine vers un acide aminé Lysine en position 466 au niveau de la séquence protéique, suivie d'un décalage du cadre de lecture induisant l'apparition d'un codon stop après 13 acides aminés).

<sup>9</sup> c.1093C>T ; p.Arg365\* (Cytosine remplacée par Thymine en position 1093 de l'ADNc ; changement de l'Arginine en position 365 en un codon stop).

<sup>10</sup> La stéréotaxie est une technique permettant de viser une structure cérébrale de manière précise, grâce à un cadre de référence et un système de coordonnées spatiales.



**Figure 1. Modélisation de l'anomalie structurelle des synapses chez les patients MCCDI.** Chez les patients MCCDI, la diminution du nombre de clusters de récepteurs au GABA<sub>A</sub> au niveau post-synaptique conduit au démantèlement partiel du réseau de gephyrin tapissant la paroi de la membrane, sans affecter la membrane pré-synaptique, entraînant vraisemblablement un déséquilibre entre neurotransmission excitatrice et inhibitrice. MCCDI : mégalencéphalie/corps calleux/déficience intellectuelle ; GABA : acide gamma-aminobutyrique ; vGAT : transporteur vésiculaire du GABA ; GABA<sub>A</sub>Rα2 : sous-unité α2 du récepteur du GABA<sub>A</sub>.

### Anomalie des synapses GABAergiques et pathologies neurodéveloppementales : des pistes thérapeutiques

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central chez les mammifères. L'équilibre dynamique entre excitation et inhibition des signaux synaptiques est crucial pour le bon fonctionnement des circuits neuronaux. Nous proposons donc que le phénotype cognitif observé chez nos patients soit en partie la conséquence d'un déséquilibre entre excitation et inhibition.

Depuis plusieurs années, de nombreux laboratoires ont testé diverses molécules modulant la transmission GABAergique sur des modèles cellulaires et animaux de nombreuses maladies neurodéveloppementales, liées à une dérégulation de la transmission GABAergique, telles que les syndromes de l'X fragile<sup>11</sup>, de Rett<sup>12</sup>, de Down<sup>13</sup>, de Tourette<sup>14</sup>, les troubles du

spectre autistique, la schizophrénie ou la neurofibromatose<sup>15</sup>.

Certaines de ces molécules font déjà l'objet d'essais cliniques. C'est le cas du traitement à la bumétanide, testé chez les patients atteints d'un syndrome de l'X fragile ou de troubles du spectre autistique, qui permet une amélioration des scores autistiques et intellectuels. Le ganaxolone, un neurostéroïde capable de stimuler les récepteurs GABA, est actuellement testé en phase 2 d'un essai clinique regroupant des enfants atteints du syndrome de l'X fragile, suite aux résultats encourageants obtenus sur le modèle murin [12]. Compte tenu des observations faites sur le modèle murin *Nono*<sup>gt</sup>, il serait intéressant de tester de telles molécules stimulatrices des récepteurs GABA chez les souris.

### En conclusion

Notre travail a permis d'identifier un nouveau syndrome, MCCDI, cliniquement reconnaissable et lié à des mutations du gène *NONO*. Il s'agit de la première démonstration du rôle des protéines de la famille DBHS dans le développement du système nerveux central. Les travaux menés dans les cellules de patients et

les souris *Nono*<sup>gt</sup> ont permis une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie. Enfin, nos résultats suggèrent que le syndrome MCCDI est une nouvelle maladie neurodéveloppementale liée au dysfonctionnement du système GABAergique, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles approches thérapeutiques visant à corriger les anomalies de neurotransmission inhibitrice observées chez ces malades. ♦

### Mutations in *NONO* lead to syndromic intellectual disability and inhibitory synaptic defects

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5<sup>th</sup> ed). Washington, DC : American Psychiatric Publishing, 2013.
2. Harel S, Jenna S. Soigner la déficience intellectuelle : la recherche d'équilibre. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 70-6.
3. De Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012 ; 367 : 1921-9.
4. Mircof D, Langouet M, Rio M, et al. Mutations in *NONO* lead to syndromic intellectual disability and inhibitory synaptic defects. *Nat Neurosci* 2015 ; 18 : 1731-6.
5. Deciphering Developmental Disorders Study. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 2015 ; 519 : 223-8.
6. Shav-Tal Y, Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO: multifunctional nuclear proteins. *FEBS Lett* 2002 ; 531 : 109-14.
7. Kowalska E, Ripberger JA, Muheim C, et al. Distinct roles of DBHS family members in the circadian transcriptional feedback loop. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 : 4585-94.
8. Jacob TC, Bogdanov YD, Magnus C, et al. Gephyrin regulates the cell surface dynamics of synaptic GABA<sub>A</sub> receptors. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 10469-78.
9. Panzanelli P, Gunn BG, Schlatter MC, et al. Distinct mechanisms regulate GABA<sub>A</sub> receptor and gephyrin clustering at perisomatic and axo-axonic synapses on CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 2011 ; 589 : 4959-80.
10. Tyagarajan SK, Fritschy JM. Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci* 2014 ; 15 : 141-56.
11. Tyagarajan SK, Ghosh H, Yevens GE, et al. Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 379-84.
12. Deidda G, Bozarth IF, Cancedda L. Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci* 2014 ; 8 : 119.
13. Inserm. *Déficiences intellectuelles. Expertise collective*. Paris : Éditions Inserm-EDPSciences, mai 2016 : 1176 p.

<sup>11</sup> Maladie génétique causée par une mutation sur le chromosome X et associée à un déficit intellectuel.

<sup>12</sup> Le syndrome de Rett est une maladie génétique définie par un trouble grave et global du développement du système nerveux central.

<sup>13</sup> Trisomie 21.

<sup>14</sup> Le syndrome de Gilles de la Tourette est une maladie neurologique à composante génétique caractérisée notamment par des tics involontaires.

<sup>15</sup> Maladie génétique touchant principalement la peau (taches cutanées) et le système nerveux (tumeurs bénignes des nerfs périphériques).

## La rapamycine ouvre l'ère des thérapies ciblées dans les malformations veineuses

Emmanuel Seront<sup>1</sup>, Nisha Limaye<sup>2</sup>, Laurence M. Boon<sup>2,3</sup>, Miikka Vikkula<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Institut Roi Albert II, département d'oncologie médicale, cliniques universitaires Saint Luc, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique ;

<sup>2</sup> Génétique Moléculaire Humaine, institut de Duve, université catholique de Louvain, Bruxelles, DDUV, Avenue Hippocrate 75, 1200 Woluwe-Saint-Lambert, Belgique ;

<sup>3</sup> Centre des anomalies vasculaires, division de chirurgie plastique, cliniques universitaires Saint-Luc, université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique. [miikka.vikkula@uclouvain.be](mailto:miikka.vikkula@uclouvain.be)

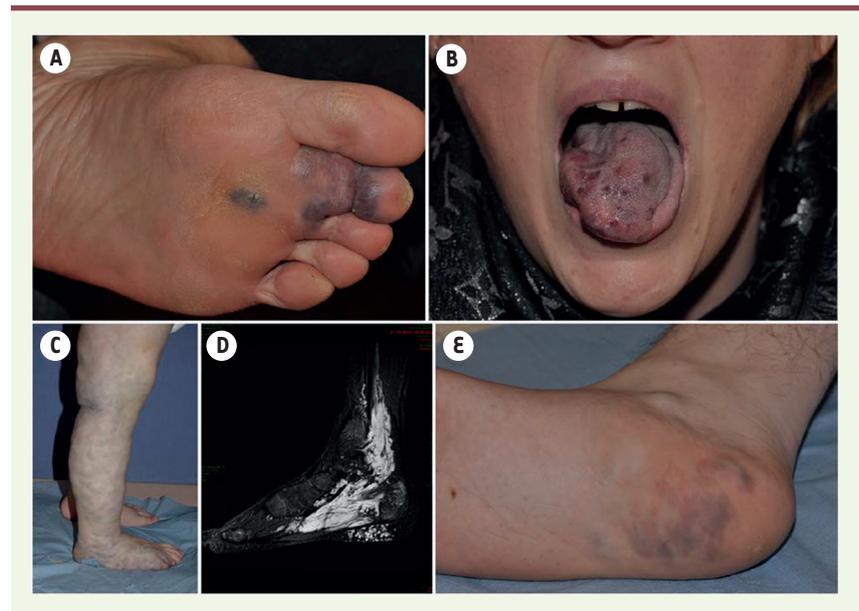


> Les malformations veineuses (MV) sont des anomalies du développement veineux entraînant la formation de veines dysplasiques<sup>1</sup> dont les parois sont déficientes en cellules musculaires lisses (appelées péricytes). Les veines apparaissant ectatiques<sup>2</sup> et dysmorphiques<sup>3</sup>, sont alors dysfonctionnelles. Bien que des formes familiales existent, les MV sont dans plus de 90 % des cas sporadiques. Localisées ou diffuses, superficielles ou profondes, les MV peuvent survenir dans n'importe quelle partie du corps (Figure 1). Elles sont en général présentes à la naissance et grandissent progressivement durant la croissance de l'individu. Ces malformations veineuses, de par leur localisation et la compression des organes, provoquent des problèmes esthétiques, des douleurs chroniques, des oedèmes ou des saignements, résultant en une morbidité et une mortalité importante. Les MV prédisposent également à une stase veineuse<sup>4</sup> entraînant un haut risque embolique. De plus, la moitié des MV étendues présente des défauts de coagulation (coagulopathie intravasculaire localisée) expliquée par des phénomènes thrombotiques entraînant une consommation des facteurs de coagulation. Actuellement, la sclérothérapie<sup>5</sup>, associée ou non à

la chirurgie, constitue le traitement standard contre les MV. Malheureusement, ces traitements restent le plus souvent non curatifs et ils ne sont pas dénués de toxicité ; beaucoup de MV sont inaccessibles et/ou persistent après traitement local. Il y a donc un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques [1].

### Implication du récepteur tyrosine kinase TIE2 et de la voie PI3K-Akt-mTOR dans les malformations veineuses

Le récepteur tyrosine kinase TIE2 (*tunica interna endothelial cell kinase 2*), situé à la surface des cellules endothéliales, ainsi qu'un de ses ligands, l'angiopoïétine-1 (Angpt1), sont des acteurs



**Figure 1. Aspects cliniques de malformations veineuses.** A. MV localisée au niveau du pied. B. MV localisée dans la muqueuse de la langue, provoquant une apnée du sommeil. C. MV touchant les extrémités inférieures associées à une coagulopathie intravasculaire localisée sévère. D-E. MV au niveau du pied et de la cheville avec atteinte musculaire, comme cela peut être observé par imagerie par résonance magnétique pondérée en T2 (visible en blanc)\*. MV : malformation veineuse.

<sup>1</sup> Déformées ou malformées.

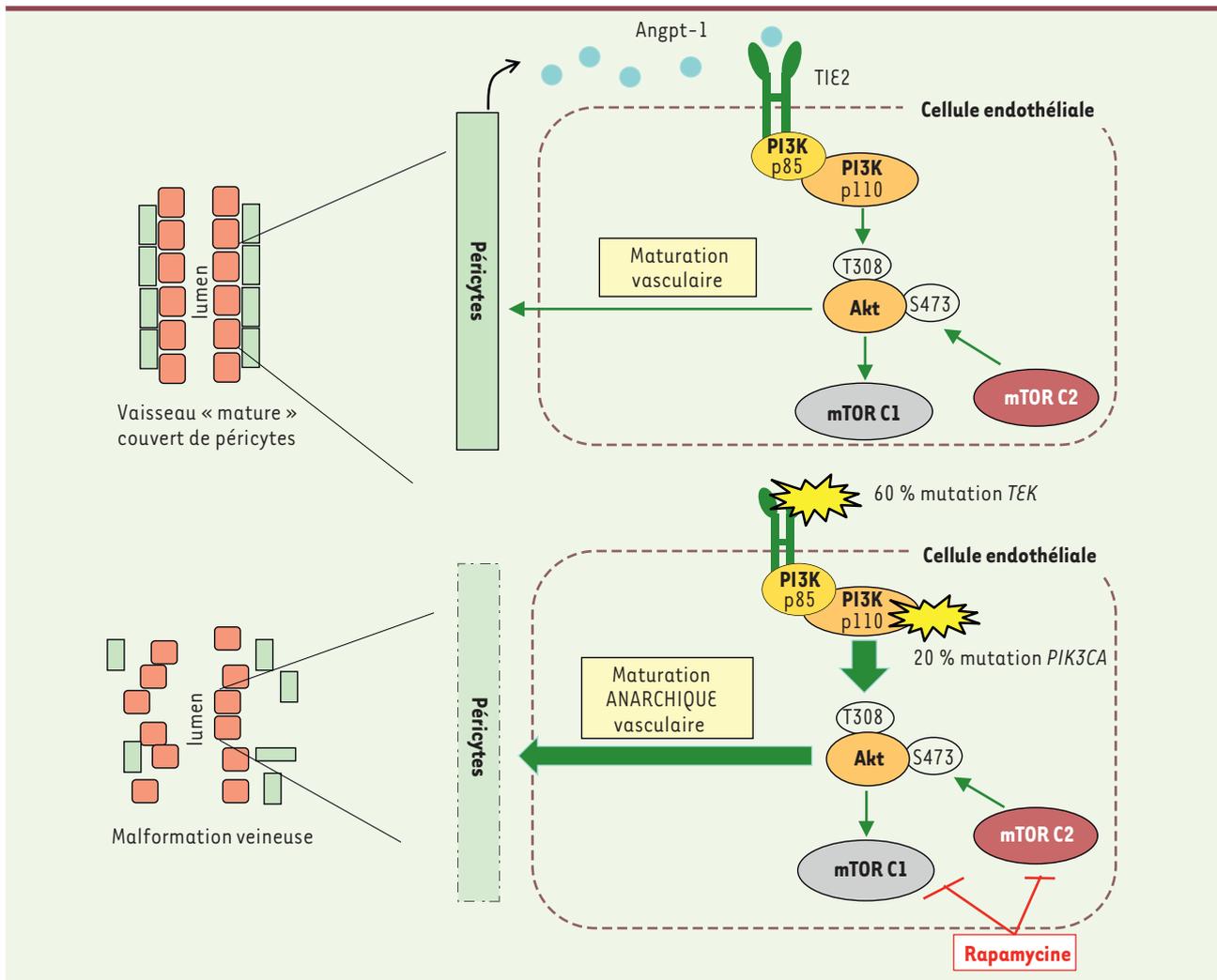
<sup>2</sup> Dilatées.

<sup>3</sup> Présentant une anomalie de leur forme.

<sup>4</sup> Stagnation du sang au niveau d'une veine.

<sup>5</sup> La sclérothérapie est un traitement non-invasif consistant en l'injection d'un produit qui va détruire la veine.

\* En résonance magnétique, la morphologie du signal émis par les protons dépend essentiellement du temps (appelé temps de relaxation) que ceux-ci mettent à revenir dans l'axe de l'aimant (temps n° 1 ou T1) et du temps qu'ils mettent à se déphaser à nouveau (temps n° 2 ou T2). Ces deux temps T1 et T2 sont propres à chaque type de tissu. En IRM T1, l'eau est noire et la graisse blanche. En IRM T2, l'eau est blanche et la graisse grise.



**Figure 2. Voie de signalisation impliquée dans le processus de maturation vasculaire.** **A.** Le récepteur tyrosine kinase TIE2 activé par un de ses ligands, l'angiopoïétine1 (ANGPT-1), stimule la voie PI3K-Akt. Akt, après une phosphorylation par PI3K et par mTORC2, régule positivement le processus de maturation vasculaire. **B.** Les mutations activatrices de TIE2 et de PIK3CA (mutations dans le gène *TEK* ou *PIK3CA*) induisent une stimulation excessive d'Akt résultant en la formation d'un réseau vasculaire dysfonctionnel. La rapamycine, en inhibant l'activité de mTORC2, empêche une activation excessive d'Akt et donc restaure la maturation vasculaire. PI3K : *phosphoinositide 3-kinase* ; PIK3CA : domaine catalytique de PI3K ; mTORC2 : *mammalian target of rapamycin complex 2*.

indispensables de la formation, de la maturation et de la stabilité vasculaire (Figure 2A). Des souris déficientes en *TIE2* ou *Angpt1* développent en effet un réseau vasculaire dysfonctionnel et dépourvu de péricytes [2]. Ce rôle du récepteur TIE2 impliquerait la voie PI3K-Akt-mTOR (*phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B – mammalian target of rapamycin*), une cascade signalétique activée par différents récepteurs cellulaires, dont TIE2. Cette voie joue un rôle important dans la croissance

et la prolifération des cellules. La protéine mTOR, au centre de cette cascade, existe sous la forme de deux complexes, le complexe 1 (mTORC1) et le complexe 2 (mTORC2). L'activation de TIE2 par son ligand entraîne, à la suite du recrutement de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, l'activation de p110, sa sous-unité catalytique. PI3K induit alors, par l'intermédiaire de différentes protéines, la phosphorylation d'Akt (sur la thréonine en position 308, Thr308). Une seconde phosphorylation (sur la

sérine en position 473, Ser473) induite par mTORC2, est nécessaire pour qu'Akt active différents facteurs de transcription comme FOXO1 (*forkhead box protein O1*) [3, 4].

Toute dérégulation du récepteur TIE2, ou de la voie PI3K-Akt, peut conduire au développement de malformations veineuses. Ainsi, les MV familiales, et plus de 60 % des formes sporadiques, présentent des mutations du gène *TEK*, codant le récepteur TIE2. Ces mutations se traduisent par une activation



soutenue de TIE2 indépendamment de sa liaison à ses ligands. La mutation de *TEK* la plus fréquemment retrouvée dans les formes familiales est la substitution R849W<sup>6</sup>, alors que dans les formes sporadiques, la mutation la plus fréquente (correspondant à 77 % des cas) est L914F<sup>7</sup> [5]. *In vitro*, les mutations de TIE2, exprimées dans des cellules endothéliales (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*), entraînent une activation accrue d'Akt et de STAT-1<sup>8</sup> (*signal transducer and activator of transcription 1*) et une diminution de la production de PDGF-B (*platelet-derived growth factor subunit B*), un facteur de croissance stimulant la maturation endothéliale par attrait des péricytes autour des cellules endothéliales [6].

#### Modèle animal de MV avec mutation de TIE2

Pour la première fois, un modèle murin de MV similaire à celles rencontrées chez les patients, a pu être développé. Ce modèle a permis de confirmer le rôle des mutations du gène codant TIE2 dans le développement des MV [7]. L'injection, dans des souris, de cellules HUVEC présentant un récepteur TIE2 muté (substitution L914F), en comparaison à des HUVEC portant un récepteur non muté (type sauvage, *wild type* [wt]), induit la formation de lésions vasculaires à croissance rapide et composées de veines ectatiques (> 50 µm de diamètre) et irrégulièrement couvertes de péricytes, à l'image des veines observées chez des patients atteints de MV. D'un point de vue fonctionnel, le débit sanguin dans ces lésions vasculaires reste très bas et non pulsatile comme pour les MV observées en clinique. Au niveau moléculaire, la mutation de TIE2 est associée à une augmentation importante de l'activité d'Akt, confirmant le rôle du récepteur dans la stimulation de l'axe PI3K-Akt (Figure 2B).

<sup>6</sup> Substitution d'un tryptophane par une arginine en position 849.

<sup>7</sup> Substitution d'une phénylalanine par une leucine en position 914.

<sup>8</sup> Facteur de transcription stimulé par l'interféron.

#### MV et mutation de PI3K

Un rôle des mutations de PI3K dans le développement des MV a également été mis en évidence chez l'homme [8]. En effet, une analyse moléculaire d'échantillons chirurgicaux provenant de 130 patients porteurs de MV localisées et uniques a permis de montrer qu'une mutation du gène *PIK3CA*, qui code le domaine catalytique de PI3K, est observée chez 20 % de ces patients. Cette mutation est également retrouvée dans de nombreux cancers et est à l'origine d'une activation excessive d'Akt. Contrairement aux MV secondaires aux mutations du gène *TEK*, la présence d'une mutation *PIK3CA* induiraient plutôt des MV ne touchant pas la peau. *In vitro*, la transfection du gène *PIK3CA* muté dans des cellules HUVEC entraîne, par rapport à des HUVEC exprimant le gène sauvage, une activation importante d'Akt et un dysmorphisme endothélial, comme observé dans les cellules HUVEC présentant le gène *TIE2* muté. L'inhibition spécifique de PI3K par un inhibiteur pharmacologique permet de réduire l'activité d'Akt et de restaurer la morphologie cellulaire.

#### La rapamycine comme traitement des malformations veineuses

La rapamycine, appelée aussi sirolimus, est une molécule connue depuis plusieurs décennies ; elle est extraite d'une algue récoltée sur l'île de Pâque (appelée aussi *Rapa-Nui*). Ses propriétés antimycotique, bactéricide, immunosuppressive et antiproliférative ont rapidement suscité l'intérêt des scientifiques. Il aura cependant fallu près de 20 ans pour identifier la cible de la rapamycine, la protéine mTOR [9] (→), participant à la cascade signalétique PI3K-Akt-mTOR. La rapamycine agit en inhibant, de façon allostérique, la protéine mTOR. En déstabilisant le complexe mTORC2, elle l'empêche ainsi de phosphoryler Akt et donc de l'activer [10] (Figure 2B). Au

(→) Voir la Synthèse de L.A. Julien et P.P. Roux, *m/s* n° 12, décembre 2010, page 1056

niveau thérapeutique, la rapamycine est utilisée couramment en pratique clinique comme immunosuppresseur pour la prévention des rejets de greffe et comme agent anticancéreux.

#### Effet de la rapamycine sur un modèle pré-clinique

Nous avons utilisé le modèle murin d'injection de cellules HUVEC porteuses d'un récepteur TIE2 muté afin d'évaluer l'efficacité de la rapamycine dans la prévention et le traitement des MV [7]. Après injection de ces cellules, les souris ont été traitées soit par la rapamycine, soit par un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de TIE2, soit par une solution contrôle. Seul le traitement par rapamycine a empêché de façon significative la croissance et la vascularisation des cellules implantées et ce, par un effet spécifique sur les cellules endothéliales exprimant un récepteur TIE2 muté, indépendamment d'un éventuel effet sur les cellules murines. Morphologiquement, la rapamycine entraîne une réduction significative du diamètre des vaisseaux et une augmentation du nombre de péricytes. En plus de son effet sur la prévention du développement des MV, la rapamycine s'est également montrée efficace dans le traitement de MV bien établies chez la souris, en stoppant la progression de ces lésions [7].

#### Effet de la rapamycine chez des patients humains

Les résultats pré-cliniques obtenus chez la souris avec la rapamycine ont encouragé l'évaluation de cette molécule chez quelques patients porteurs de MV. Six patients atteints de MV réfractaires aux traitements standards et très symptomatiques (présentant des douleurs, un déficit fonctionnel, des saignements, des infections récurrentes, un œdème, etc.) ont été traités par une prise orale quotidienne de rapamycine (2 mg par jour) en continu. Trois de ces patients étaient porteurs d'une mutation touchant le gène *TEK*, les trois autres présentaient une mutation du gène *PIK3CA*.

<b>Efficacité clinique : Douleur (0-10)</b>			
Ligne de base Médiane (déviati on standard)	3 mois	6 mois	1 an
8 (6,75-9,00)	2,0 (1,00-5,50)	2,0 (1,50-7,00)	3,00 (0,50-6,00)
<b>Efficacité biologique : D-dimères (négatif &lt; 500 ng/mL)</b>			
Ligne de base Médiane (déviati on standard)	3 mois	6 mois	1 an
6 723 (1 685-12 110)	1 934 (920-2 766)	2 562 (677-4 368)	1 085 (884-1 441)
<b>Effets secondaires</b>			
Effets secondaires : (n [%])	Total	Grade 1 - 2	Grade 3 - 4
Fatigue	2 (33)	2 (33)	0 (0)
Céphalée	2 (33)	2 (17)	0 (0)
Stomatite	3 (50)	2 (33)	1 (17)
Vomissement	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Diarrhée	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Syndrome grippal	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Neuropathie	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Œdème	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Rhinorrhée	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Arthralgie	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Vertige	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Rash cutané	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Sécheresse cutanée	1 (17)	1 (17)	0 (0)
Tumeur cutanée basocellulaire (après 1 an)	1 (17)	0 (0)	1 (17)

**Tableau 1. Efficacité et effets secondaires de la rapamycine observés dans une étude pilote.**

La douleur est mesurée par une échelle (*visual analogic scale*), les patients devant évaluer l'intensité de leur douleur entre 0 (pas de douleur) et 10 (douleur la plus extrême possible). La mesure biologique correspond à un dosage sanguin des D-dimères. Les effets secondaires sont définis de façon standardisée telle que proposée par le NIH (*National institute of health*) dans le CTCAE v3 (*Common terminology criteria for adverse events v3*) et leur intensité est évaluée par grades (grade 1 : léger ; grade 2 : modéré ; grade 3 : sévère ; grade 4 : mettant la vie en danger) (d'après [7]).

Tous ces patients ont vu, dans le mois suivant le début du traitement, une diminution significative de la douleur et une amélioration de la qualité de

vie (diminution des saignements et des œdèmes et amélioration fonctionnelle) (Tableau 1). Les paramètres biologiques de coagulation (évalués par dosage des

D-dimères<sup>9</sup>) se sont rapidement améliorés et les images radiologiques ont montré une diminution du volume des MV à 1 an. Le traitement s'est montré de manière générale très bien toléré ; les effets secondaires les plus fréquents ont été des céphalées, des éruptions cutanées (*rash*), des aphtes et une diarrhée, mais tous de sévérité légère à modérée et tous réversibles par traitements symptomatiques. Un patient a cependant présenté, après un an, un carcinome basocellulaire, possiblement favorisé par l'effet immunosuppresseur de la rapamycine. Un autre patient a présenté une mucite<sup>10</sup> sévère ayant nécessité un arrêt du traitement [7].

La rapamycine pourrait donc aujourd'hui constituer le premier traitement pharmacologique des MV réfractaires aux traitements standards. Faisant suite aux résultats cliniques encourageants que nous avons obtenus avec notre petit nombre de patients, une étude clinique de phase 3 multicentrique (NCT02638389) est actuellement en cours afin de confirmer l'efficacité clinique de la rapamycine, ainsi que de s'assurer de sa bonne tolérance et de son innocuité à long terme. Cette étude permettra également de mieux préciser la place de la rapamycine dans la stratégie thérapeutique et d'identifier d'éventuelles caractéristiques cliniques et moléculaires prédictives d'une réponse thérapeutique. La rapamycine ouvre donc la voie au développement de nouvelles thérapies ciblées dans le domaine des MV. D'autres molécules interférant avec la voie PI3K-Akt-mTOR, comme des inhibiteurs spécifiques de PI3K ou d'Akt, pourraient également être investiguées à court terme afin de mieux cibler l'anomalie responsable des MV et de limiter les effets secondaires. ♦

### Rapamycin opens the era of targeted molecular therapy of venous malformations

<sup>9</sup> Produits de la dégradation de la fibrine, une protéine impliquée dans la coagulation. Leur présence dans le sang peut être le signe de la formation d'un caillot sanguin.

<sup>10</sup> Inflammation des muqueuses.

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Domp Martin A, Viikkula M, Boon LM. Venous malformation: update on aetiopathogenesis, diagnosis and management. *Phlebology* 2010 ; 25 : 224-35.
2. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996 ; 87 : 1171-80.
3. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012 ; 149 : 274-93.
4. Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y, et al. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1-8.
5. Limaye N, Wouters V, Uebelhoer M, et al. Somatic mutations in angiopoietin receptor gene TEK cause solitary and multiple sporadic venous malformations. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 118-24.
6. Uebelhoer M, Nätyнки M, Kangas J, et al. Venous malformation-causative TIE2 mutations mediate an AKT-dependent decrease in PDGFB. *Hum Mol Genet* 2013 ; 22 : 3438-48.
7. Boscolo E, Limaye N, Huang L, et al. Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects. *J Clin Invest* 2015 ; 125 : 3491-504.
8. Limaye N, Kangas J, Mendola A, et al. Somatic activating PIK3CA mutations cause venous malformation. *Am J Hum Genet* 2015 ; 97 : 914-21.
9. Julien LA, Roux PP. mTOR, la cible fonctionnelle de la rapamycine. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 1056-60.
10. Sarbassov D, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006 ; 22 : 159-68.

