



Les polydnavirus : des virus qui pratiquent le transfert de gènes depuis 100 millions d'années

Catherine Dupuy, Georges Periquet,
Annie Bézier, Jean-Michel Drezen

Institut de recherche sur la biologie de l'insecte,
UMR CNRS 6035, Université François Rabelais,
Parc Grandmont, 37200 Tours, France.
catherine.dupuy@univ-tours.fr;
georges.periquet@univ-tours.fr;
annie.bezier@univ-tours.fr;
drezen@univ-tours.fr

Les polydnavirus : des virus utilisés par des guêpes pour réussir leur parasitisme

Les virus sont définis comme des parasites intracellulaires obligatoires qui ont besoin d'une cellule hôte pour se multiplier. Mais dans le monde très divers des virus, il existe un cas très particulier, celui des Polydnavirus (PDV) qui sont des symbiontes obligatoires de guêpes parasites. Les PDV sont des virus atypiques en raison de la singularité de leur cycle biologique et de la relation privilégiée qu'ils ont établie avec leurs hôtes : des guêpes parasitoïdes appartenant aux familles des ichneumonides et des braconides. Ces guêpes parasitoïdes pondent leurs œufs à l'intérieur d'un autre insecte hôte, la chenille d'un lépidoptère [1]. Après éclosion, les larves du parasitoïde se développent à l'intérieur de la chenille, puis juste avant leur métamorphose, sortent de la chenille et tissent des cocons dont émergeront les adultes (Figure 1). Le corps de l'hôte, bien que constituant l'apport nutritif exclusif du parasitoïde, est un environnement hostile. En effet, les insectes possèdent un système immunitaire dont l'une des fonctions consiste à former une gangue de cellules immunitaires autour d'un corps étranger, par exemple un œuf de parasitoïde non adapté à l'hôte, conduisant à sa destruction : c'est la réaction d'encapsulation [2]. Afin de contourner cette réponse immunitaire, certains parasitoïdes ont adopté la stratégie originale d'utiliser un virus - de type polydnavirus - leur procurant l'aide nécessaire

pour assurer le développement des larves parasites.

Une association mutualiste entre un virus et un eucaryote

Le cycle de ces virus est complètement atypique car il se déroule dans deux hôtes différents. Dans la guêpe parasitoïde, le génome viral est intégré au génome de la guêpe sous la forme d'un provirus (Figure 1). La réplication de l'ADN viral s'effectue uniquement chez les femelles parasitoïdes, à partir de la forme provirale intégrée, pour former plusieurs cercles d'ADN double brin qui sont inclus dans les particules virales en formation. Ces particules sont injectées dans la chenille hôte au moment de la ponte, puis les gènes contenus dans l'ADN des particules sont exprimés, entraînant l'inactivation des mécanismes de défense de l'hôte et la perturbation de son développement : la chenille parasitée n'effectue pas sa métamorphose et ne devient jamais un papillon. Les virus ne se répliquant pas dans la chenille parasitée, ils sont transmis verticalement à partir de la forme provirale intégrée. Cette relation entre la guêpe et le virus est l'un des rares exemples d'association mutualiste entre un virus et un eucaryote, autre celles décrites pour certains rétrovirus endogènes impliqués dans la formation des lacunes du placenta chez les primates [3].

Au sein de la famille des *Polydnaviridae*, deux genres ont été définis : les ichnovirus associés aux guêpes de la famille des *Ichneumonidae*, et les bracovirus présents chez les *Braconidae*. Les associa-

tions entre les guêpes braconides et leurs bracovirus ont été les plus étudiées. Plus de 17 500 espèces de guêpes braconides sont associées à un bracovirus. Elles sont classées en 6 sous-familles qui forment un groupe monophylétique appelé complexe *Microgastroïde* dont l'ancêtre vivait il y a environ 100 millions d'années (Figure 2A). Cette monophylie suggère que les bracovirus actuels sont issus d'un virus ancêtre dont l'ADN s'est intégré dans le génome de la guêpe ancêtre [4]. Cet unique évènement d'intégration serait à l'origine de toutes les associations guêpes-bracovirus que nous connaissons actuellement.

Le génome des particules injectées ne possède pas de signature virale

Afin de comprendre l'origine et l'évolution des associations impliquant les guêpes braconides et leurs bracovirus, nous avons réalisé le séquençage et l'annotation du bracovirus *CcBV* hébergé par la guêpe *Cotesia congregata*. Le génome contenu dans les particules virales injectées chez la chenille hôte possède une taille totale de 606 300 pb. C'est un génome composé de 32 cercles d'ADN double brin. Le génome de *CcBV* possède une faible densité de gènes (24 % de séquences codantes) dont la majorité possède un intron (69 %). Parmi les 165 gènes, près de la moitié ne présentent aucune similitude avec des gènes préalablement décrits. L'autre moitié est constituée de gènes organisés en familles multigéniques codant pour des protéines qui ressemblent à des



facteurs de virulence utilisés par des bactéries pathogènes ou des nématodes parasites pour réussir leur infection [5]. Cependant, de façon inattendue, ce génome est quasiment dépourvu de gènes homologues à des gènes viraux pouvant intervenir dans la réplication, ou coder pour les protéines de structure. Depuis ce premier travail d'annotation, d'autres génomes de bracovirus ont été séquencés et tous possèdent ces mêmes caractéristiques, très différentes de celles habituellement rencontrées dans les génomes de virus classiques [6-8].

Un nudivirus ancêtre

à l'origine des bracovirus

La pauvreté en gènes viraux peut s'expliquer si l'on tient compte du cycle de ces virus qui ne se répliquent pas dans la chenille hôte parasitée, mais sont uniquement transmis au cours des générations de guêpes par transmission ménéglienne. Les gènes impliqués dans la réplication n'ont donc pas besoin d'être présents dans le génome viral encapsidé dans les particules virales injectées dans la chenille. Afin de rechercher les gènes authentiquement viraux impliqués dans la production des particules virales et pouvant révéler la nature du virus ancêtre, deux approches ont été utili-

sées : (1) L'analyse du transcriptome des ovaires de guêpes répliquant le virus. (2) L'analyse des protéines constitutives des particules virales purifiées. Ces deux approches ont été réalisées sur deux guêpes phylogénétiquement éloignées, *Cotesia congregata* et *Chelonus inanitus*. L'analyse transcriptomique nous a permis d'identifier 24 gènes homologues à des gènes de nudivirus, eux-mêmes apparentés aux baculovirus. Parmi ces gènes se trouvent notamment des gènes codant pour les sous-unités de l'ARN polymérase nudivirale, des gènes codant pour des protéines d'enveloppe et des protéines nécessaires à l'encapsulation des génomes viraux. Deux de ces gènes ont pu être isolés également dans 3 autres groupes de guêpes associées à des bracovirus (*Cardiochilinae*, *Miracinae* et *Mendesellinae*) (Figure 2A) confirmant la présence de la machinerie virale dans l'ensemble du complexe microgastroïde. De plus, des analyses complémentaires ont permis d'étudier l'organisation des gènes nudiviraux : 6 des gènes étudiés sont organisés en cluster et 6 autres sont dispersés dans le génome de la guêpe [9]. Enfin l'analyse protéique a permis de montrer que 20 protéines codées par ces gènes composent les particules virales

de bracovirus. Les gènes nudiviraux sont donc bien directement impliqués dans la production des particules de bracovirus.

Une nouvelle forme de virus : les virus intégrés à génome mosaïque

Ces résultats constituent des éléments concordants indiquant que les bracovirus actuels sont issus d'un nudivirus. De plus, la conservation de la machinerie nudivirale dans les différentes lignées de guêpes braconides associées à des virus confirme leur histoire évolutive commune. Toutes ces espèces de braconides dérivent d'un ancêtre commun, ayant intégré un virus de type nudivirus il y a environ 100 millions d'années. Le génome des bracovirus actuels est ainsi le résultat d'une longue co-évolution virus/guêpe conduisant à une organisation particulièrement originale. C'est en fait un génome bipartite qui réside dans le génome de la guêpe (Figure 2B), une partie est constituée de gènes nudiviraux et produit les particules tandis que l'autre partie correspond à l'ADN des particules injectées dans l'hôte. Le génome inclus dans les particules virales ne porte plus de gènes viraux mais des gènes de guêpes dont la fonction actuelle est de produire dans l'hôte parasité des facteurs de virulence. À ce

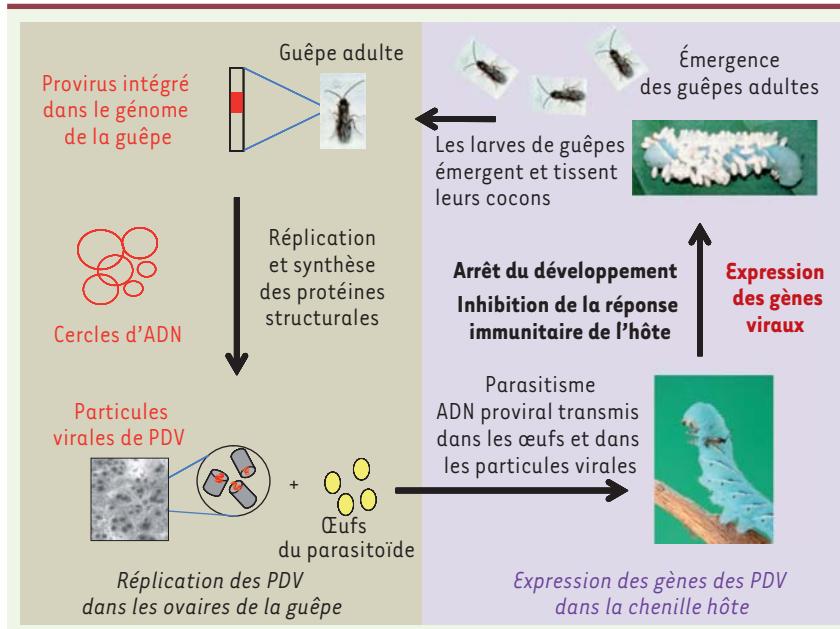


Figure 1. Cycle du polydnavirus et de la guêpe parasitoïde. L'ADN viral intégré au génome de la guêpe (ici *Cotesia congregata*) est transmis verticalement aux générations suivantes sous forme de provirus. Dans les cellules ovariques, il y a réplication et excision des cercles viraux à partir de la forme provirale intégrée. Les cercles sont encapsidés pour former les particules virales qui seront injectées, au moment de la ponte, dans l'hôte (ici la chenille du papillon *Manduca sexta*). Les particules virales entrent alors dans les cellules hôtes et les gènes viraux sont exprimés. L'expression des gènes viraux inhibe la réponse immunitaire de l'hôte et permet le succès du parasitisme.

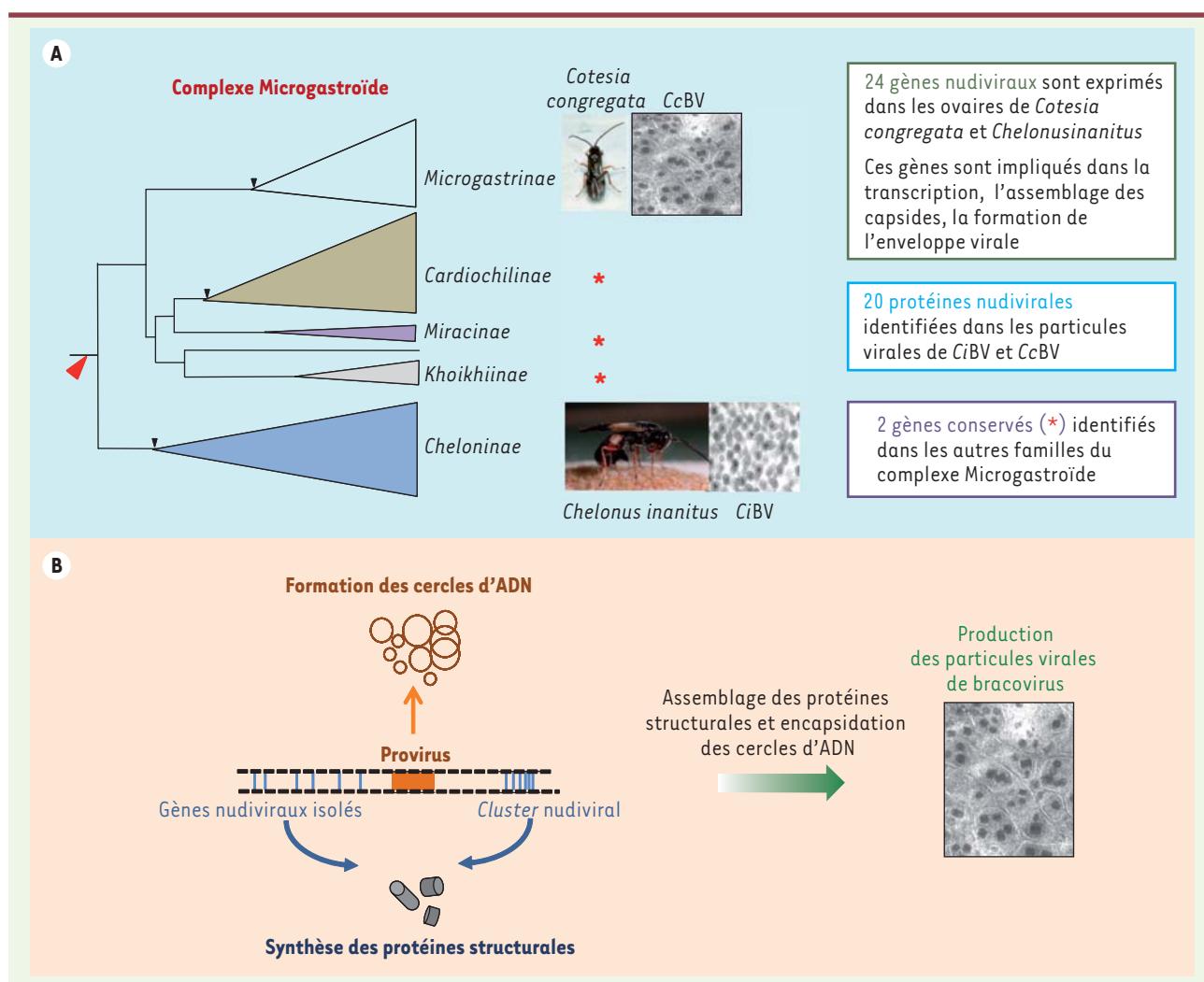


Figure 2. Les bracovirus ont pour origine un nudivirus ancêtre. **A.** Arbre phylogénétique représentant l'histoire évolutive du complexe Microgastroïde et de la conservation de la machinerie nudivirale parmi différentes espèces de guêpes. Les gènes nudiviraux ont été amplifiés à partir de l'ADNc extrait des ovaires de guêpe de *Cotesia congregata* et *Chelonus inanitus*. Deux des gènes viraux ont été également retrouvés chez 3 autres espèces de guêpe du complexe Microgastroïde (*). **B.** Représentation schématique de l'organisation du génome bipartite des bracovirus. Ce génome est constitué d'un locus proviral, à partir duquel sont formés les cercles d'ADN inclus dans les particules virales, et de gènes d'origine nudivirale (isolés pour certains et organisés en cluster pour d'autres). Ces gènes correspondent à la machinerie réplicative du virus et aux protéines de structure des particules virales.

titre ces virus peuvent donc être considérés comme des pseudoparticules naturelles capables de transférer des gènes et dont la production présente de nombreuses analogies avec celle des vecteurs de thérapie génique. ♦

Polydnaviruses : viruses used as gene transfert vectors for 100 MYA

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Quicke DLJ. *Parasitic wasps*. London : Chapman and Hall, 1997.
- Kanost M, Zepp MK, Ladendorff NE, Anderson LA. Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from haemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994 ; 27 : 123-36.
- Muir A, Lever A, Moffet A. Expression and functions of human endogenous retroviruses in the placenta: an update. *Placenta* 2004 ; 25 : 16-25.
- Murphy N, Banks JC, Whitfield JB, Austin AD. Phylogeny of the parasitic microgastroid subfamilies (Hymenoptera: Braconidae) based on sequence data from seven genes, with an improved time estimate of the origin of the lineage. *Mol Phylogenet Evol* 2008 ; 47 : 378-95.
- Espagne E, Dupuy C, Huguet E, et al. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* 2004 ; 306 : 286-9.
- Dupuy C, Huguet E, Drezen JM. Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses. *Virus Res* 2006 ; 117 : 81-9.
- Tanaka K, Lapointe R, Barney WE, et al. Shared and species-specific features among ichnovirus genomes. *Virology* 2007 ; 363 : 26-35.
- Desjardins CA, Gundersen-Rindal DE, Hostetler, Tallon LJ, et al. 2008. Comparative genomics of mutualistic viruses of Glyptapanteles parasitic wasps. *Genome Biol* 2009 ; 9 : R183.
- Bézier A, Annaheim M, Herbinet J, et al. Polydnaviruses of Braconid wasps derive from an ancestral Nudivirus. *Science* 2009 ; 323 : 926-30.

Les multiples fonctions des protéines lipolytiques à domaine patatine

Thierry Heitz

Les glycérolipides sont utilisés abondamment dans les édifices cellulaires. Ainsi, ils s'organisent en membranes lipidiques (phospho- ou galacto-lipides) délimitant les compartiments subcellulaires ou constituent des sites de stockage de réserves énergétiques (triglycérides). Ces lipides sont constamment remaniés par une cohorte d'enzymes hydrolytiques en réponse à des signaux environnementaux ou encore en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme. Les progrès récents de la génomique ont conduit à l'identification de nombreuses protéines qui partagent un domaine appelé « patatine », décrit initialement dans la protéine de réserve principale du tubercule de pomme de terre, d'où son nom. Le fait remarquable est que ce domaine catalytique (Pfam 01734) a ensuite été détecté dans l'ensemble du monde vivant, incluant des bactéries, levures, nématodes, insectes, plantes et vertébrés. Plus particulièrement, différentes formes de ce domaine conservé d'environ 180 acides aminés confèrent des activités lipolytiques étonnamment variables, puisque capables de libérer des acides gras à partir de phospholipides, lysophospholipides, triglycérides, galactolipides ou même d'esters de rétinol. D'autre part, la signature patatine est souvent associée à d'autres domaines fonctionnels, reflétant des sites et modes d'action multiples. Il apparaît maintenant que ces protéines, en ciblant divers lipides, exercent des fonctions distinctes dans des processus aussi variés que la virulence bactérienne, l'homéostasie lipidique, l'exécution de la mort cellulaire ou encore la croissance post-germinative.

Les enzymes lipases à domaine patatine orchestrent la gestion des réserves lipidiques

Cet article fait écho à une synthèse publiée dans ce même numéro de *Médecine/Sciences* (→) et qui traite des données récentes concernant les activités et fonctions physiologiques des protéines à domaine patatine chez les mammifères, appelées peu judicieusement PNPLA (*patatin domain phospholipase*), puisque toutes ne présentent pas une activité phospholipase.

Le génome humain contient par exemple 9 gènes codant des protéines PNPLA, se répartissant en 3 sous-familles représentées par les lysophospholipases de type *neuropathy target esterase* (NT ϵ), les phospholipases A₂ calcium-indépendantes de type iPLA₂β et γ, et les acylglycérol lipases/transacylases de type *adipose triglyceride lipase* (ATGL) et adiponutrine [1]. Ces deux dernières protéines ont été particulièrement étudiées et sont maintenant reconnues comme des enzymes majeures dans la gestion anabolique et catabolique des réserves de triglycérides, notamment en réponse à l'insuline dans les adipocytes [2]. Il est important de noter que des mutations ont été détectées dans ces 3 types de PNPLA et sont responsables de plusieurs pathologies humaines entraînant des défauts dans l'homéostasie lipidique, des troubles de l'ostéogénèse ou des dysfonctionnements neurologiques.

Peu après l'identification de la lipase ATGL [3], des orthologues ont été isolés chez la drosophile, lipase Brummer ou bmm [4], et chez la levure, Tgl3 et

(→) voir synthèse
S. Baulande
page ???

Institut de Biologie
Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS),
12, rue du Général Zimmer,
67084 Strasbourg Cedex, France.
Thierry.Heitz@ibmp-up.u-strasbg.fr

Tgl4 [5], et leur inactivation génétique conduit à l'accumulation excessive de triglycérides, montrant que chez ces organismes également, des PNPLA sont directement impliquées dans la mobilisation de lipides de réserve. Chez les végétaux, la patatine a été découverte dans les tubercules de pomme de terre il y a plusieurs décennies [6], et des formes moins abondantes l'ont été dans les parties aériennes de nombreuses espèces végétales, notamment en situation de stress. L'identification de SDP1 (*sugar-dependent 1*), une TAG lipase faiblement reliée à la patatine mais jouant un rôle majeur dans la mobilisation des réserves nécessaire à la croissance post-germinative chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* est relativement récente [7]. Cette espèce, comme toutes les plantes dotées de graines oléagineuses, utilise la dégradation de triglycérides et la β-oxydation des acides gras libérés pour subvenir aux besoins énergétiques lors de la croissance pré-photosynthétique de la plantule. Bien que diverses lipases végétales aient été isolées de corps lipidiques, seul un crible génétique recherchant des mutants incapables de dégrader leurs triglycérides après germination (et ne croissant qu'en présence de saccharose) a permis d'identifier le mutant *sdp1* [7].

Les fonctions des protéines à domaine patatine dans les interactions pathogéniques

L'implication récente de protéines à domaine patatine dans la gestion de l'homéostasie lipidique a été précédée de la publication de données décrivant

Phylum	Organisme	Protéine PNPLA	Activité enzymatique	Fonction biologique
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ExoU	Lysophospholipase	Virulence bactérienne
	<i>Legionella pneumophila</i>	PatD	ND	Virulence bactérienne
Levure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tgl4	TAG lipase ?	Homéostasie lipidique
Insecte	<i>Drosophila melanogaster</i>	Brummer	TAG lipase	Homéostasie lipidique
Mammifères	Homme, Souris	ATGL, Adiponutrine	TAG lipase, transacylase	Homéostasie lipidique dans les adipocytes
		iPLA2 β et γ	Phospholipase	Fonctions cellulaires très larges (β), homéostasie lipidique cardiaque (γ)
		NTE	Lysophospholipase	Maintien intégrité des axones
Plantes	Pomme de terre	Patatine	Phospholipase, galactolipase, sulfolipase	Protéine de réserve des tubercules
	Tabac	NtPAT	Galactolipase, phospholipase	Défense antimicrobienne
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtPLP2/AtpPLA-II α	Galactolipase, phospholipase	Défense antimicrobienne, mort cellulaire
		AtpPLA-I	Galactolipase, phospholipase	Défense antifongique, homéostasie acide jasmonique
		AtSDP1	TAG lipase	Hydrolyse triglycérides dans la croissance post-germinative

Tableau I. Quelques exemples de la diversité et des fonctions des protéines à domaine patatine (PNPLA) dans le monde vivant. ATGL : adipose triglyceride lipase ; NTE : neuropathy target esterase ; TAG : triacyl-glycérol ; ND : non déterminé.

l'intervention de protéines à domaine PNPLA dans certaines interactions pathogéniques, ces protéines provenant soit de l'agresseur, soit de l'organisme agressé. Ainsi, les effets cytotoxiques de la protéine exoU sécrétée par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* dans les cellules pulmonaires ou de la cornée sont médiés par l'activité lysophospholipase portée par un domaine patatine [8]. L'opéron *bdhA-patD* est également nécessaire à la virulence de *Legionella pneumophila* [9]. De façon plus générale, des explorations génomiques semblent indiquer une corrélation positive entre le nombre de gènes codant des protéines à domaine patatine dans les génomes bactériens et le degré de virulence de ces microbes [10]. Dans un contexte physiopathologique, l'étude des plantes révèle une situation encore plus complexe. Notre équipe a montré que des isoformes de pata-

tine issues de l'hôte apparaissent dans les feuilles de tabac ou d'*Arabidopsis* réagissant à des infections microbien-nes par une forme de mort cellulaire programmée [11]. Ces isoformes sont inactives sur les triglycérides, comme l'est la patatine de tubercule de pomme de terre, mais présentent des activités phospholipase A et surtout galactolipase. Ainsi, l'inactivation ou la surexpression du gène *PLP2* chez *Arabidopsis* diminue ou aggrave respectivement les symptômes de mort cellulaire et a des effets différenciels sur la résistance antimicrobienne. L'interprétation des données suggère que *PLP2* participe à l'arsenal défensif de la plante en alimen-tant la synthèse de certains signaux cellulaires dérivés d'acides gras et en catalysant le démantèlement de membranes lipidiques nécessaire à l'exécu-tion rapide de la mort cellulaire [12]. De même, AtPLA-I, ressemblant aux iPLA2

animales, est requise pour la résistance anti-fongique. On sait de plus que des bactéries phytopathogènes possèdent également une panoplie de gènes *PNPLA* dont l'implication dans la stratégie de colonisation des plantes par ces bactéries reste à déterminer. Alors qu'elle a été cantonnée pendant longtemps au simple rôle de protéine de réserve chez la pomme de terre (elle représente jusqu'à 40 % des protéines solubles du tubercule), la patatine et surtout son domaine catalytique constituent en fait un motif ancien utilisé dans tous les organismes. En ciblant des structures lipidiques distinctes, différentes PNPLA médient un nombre croissant de fonctions biologiques impor-tantes dans le développement et la pathologie. ♦

The diverse functions of lipolytic patatin-domain proteins across kingdoms

**CONFLIT D'INTÉRÊTS**

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

RÉFÉRENCES

- Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 2009; 50 (suppl) : S63-8.
- Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, et al. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 2006; 55 : 148-57.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004; 306 : 1383-6.
- Gronke S, Mildner A, Fellert S, et al. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* 2005; 1 : 323-30.
- Kurat CF, Natter K, Petschnigg J, et al. Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* 2005; 281 : 491-500.
- Racusen D, Foote M. A major soluble glycoprotein of potato tubers. *J Food Biochem* 1980; 4 : 43-52.
- Eastmond PJ. Sugar-Dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 2006; 18 : 665-75.
- Pankhania RR, Tamura M, Allmond LR, et al. *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit Care Med* 2004; 32 : 2293-9.
- Aurass P, Pless B, Rydzewski K, et al. bdhA-patD operon as a virulence determinant, revealed by a novel large-scale approach for identification of *Legionella pneumophila* mutants defective for amoeba infection. *Appl Environ Microbiol* 2009 ; 75 : 4506-15.
- Banerji S, Flieger A. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* 2004; 150 : 522-5.
- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, et al. A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005; 44 : 810-25.
- La Camera S, Balague C, Göbel C, et al. The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 2009 ; 2 : 469-81.

NOUVELLE

Du nouveau dans la compréhension de la reprogrammation post-méiotique du génome mâle

Sophie Rousseaux, Carlo Petosa, Christoph W. Müller, Saadi Khochbin

S. Rousseaux, S. Khochbin : Inserm U823 ; Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France.
C. Petosa : Institut de biologie structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, 41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France.
C.W. Müller : European molecular biology laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117, Heidelberg, Allemagne.
khochbin@ujf-grenoble.fr

Reorganisation du génome des cellules haploïdes

La compaction extrême du génome mâle qui fait suite à la méiose est un phénomène très conservé chez les eucaryotes mais ses mécanismes moléculaires restent paradoxalement presque totalement inconnus [1]. Dans tous les organismes concernés, le but de ce processus est de préparer le génome à affronter un environnement nouveau et souvent inhospitalier. La spermatogenèse obéit parfaitement à cette règle et comporte une phase post-méiotique connue sous le nom de la spermiogenèse durant laquelle la maturation des cellules haploïdes ou spermatides s'achève. Des réorganisations globales du génome se produisent lors de la différenciation des spermatides, caractérisées par le remplacement de la majorité des histones par de petites protéines basiques en deux vagues successives. Dans un premier temps,

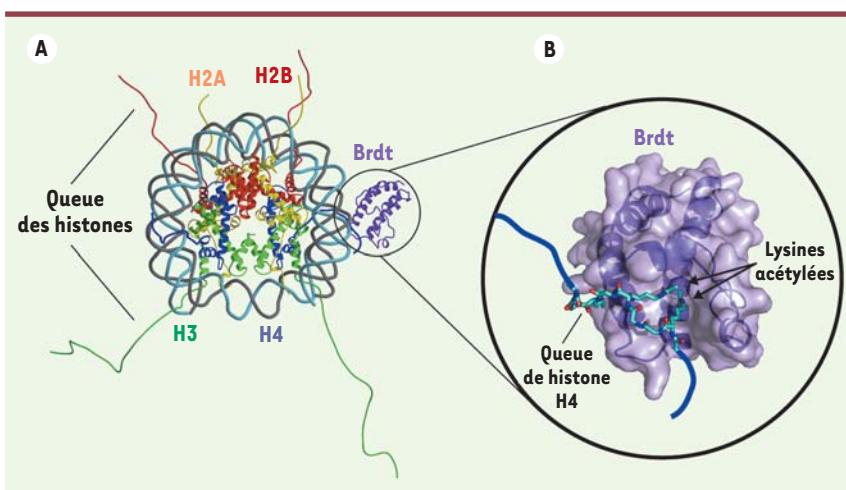
les histones sont remplacées par des protéines de transition (TP) qui, dans un deuxième temps, sont elles-mêmes remplacées par les protamines (Prm). Ces réorganisations génomiques sont en réalité plus complexes dans la mesure où des variants d'histone spécifiques des cellules spermatogéniques sont également massivement synthétisés durant les phases méiotiques et post-méiotiques et en particulier très tardivement, en même temps que les TP et les Prm, pour structurer des régions génomiques spécifiques [2, 3].

Bien que ces réorganisations génomiques soient de mieux en mieux caractérisées, les mécanismes moléculaires qui les contrôlent nous échappent complètement. Par exemple, nous ne savons pas comment les histones sont enlevées et remplacées ni ce qu'elles deviennent. Nous ne savons pas non plus comment les protéines basiques, notamment les

TP, Prm et les variants d'histones, sont assemblées ni quelles sont les régions génomiques concernées. De plus, les histones étant absentes de la plupart des régions génomiques, il est important de savoir quels sont les éléments qui portent l'indispensable code épigénétique du génome mâle. Toutes ces questions fondamentales, ainsi que de nombreuses autres, restent actuellement sans réponse. Ainsi, les mécanismes qui dirigent la compaction post-méiotique du génome mâle peuvent être considérés comme une véritable boîte noire de la biologie moderne.

Hyperacétylation des histones, signal initiateur des réorganisations génomiques

Dans un grand nombre d'espèces, les premières analyses de la chromatine de cellules spermatogéniques ont mis en évidence l'occurrence d'une



sur la queue d'une histone H4. **B.** Structure atomique de Brdt-BD1 en complexe avec une queue acétylée d'une histone H4. Brdt fixe la queue de H4 par l'intermédiaire d'une poche qui reconnaît simultanément deux lysines acétylées de la queue.

hyperacétylation globale affectant la chromatine [2]. Chez la souris et l'homme, une hyperacétylation couvrant pratiquement tout le génome se produit dès le début de l'elongation des spermatides et précède le remplacement des histones par les TP. De manière surprenante, cette hyperacétylation se propage dans tout le génome alors que l'activité transcriptionnelle générale cesse, créant ainsi une situation inhabituelle, en apparence contradiction avec le dogme établi du rôle activateur de la transcription de l'acétylation des histones dans les cellules somatiques [3].

Dans la mesure où cette hyperacétylation de la chromatine marque le début des grandes transitions structurales du génome haploïde, il est envisageable qu'elle joue un rôle déterminant dans ce processus. Suivant cette logique, les protéines à bromodomaine, module structural capable de reconnaître les lysines acétylées, apparaissent comme de très bons candidats susceptibles de contrôler les événements qui dépendent de cette hyperacétylation. Nos investigations motivées par cette hypothèse ont permis d'identifier Brdt, une protéine à double bromodomaine d'expression spécifique dans les cellules spermatogéniques, comme un facteur capable de réorganiser spécifiquement la chromatine acé-

tylée [4]. Les propriétés biochimiques remarquables de Brdt, qui s'est révélée capable d'induire une compaction spectaculaire de la chromatine acétylée, ont motivé des études supplémentaires visant à comprendre les bases structurales de sa fonction. Ces travaux ont apporté une information déterminante pour la compréhension des fonctions de ce facteur. Le premier bromodomaine de Brdt (BD1) interagit avec l'extrémité de l'histone H4 uniquement quand celle-ci est acétylée simultanément en deux positions précises : la lysine 5 et la lysine 8 (Figure 1). Le deuxième bromodomaine BD2, quant à lui, reconnaît l'extrémité amino-terminale de l'histone H3 portant une acétylation au niveau de sa lysine 18 [5]. La capacité du premier bromodomaine BD1 de Brdt à reconnaître spécifiquement la double acétylation de H4 au niveau de K5 et K8 constitue un élément important dans la compréhension des fonctions de cette protéine. En effet, selon le modèle « zip », l'hyperacétylation de l'histone H4 suit un ordre précis et l'acétylation des deux lysines K5 et K8 est indicative de la forme tétracétylée de H4 [6]. Selon ces données, Brdt n'entrerait en action que si H4 se trouve sous une forme hyperacétylée. Ainsi ce facteur peut distinguer la forme

Figure 1. Détails atomiques de la reconnaissance de la chromatine acétylée par Brdt.

A. Modèle d'un nucléosome en complexe avec Brdt. Chaque nucléosome est composé de 146 paires de base d'ADN (en gris et cyan) enroulées autour d'un octamère comprenant les histones H2A (jaune), H2B (rouge), H3 (vert) et H4 (bleu). Les queues amino-terminales des histones se projettent à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome et sont soumises à des modifications covalentes, dont l'acétylation, la phosphorylation, et la méthylation. La figure présente un modèle hypothétique du premier bromodomaine (BD1) de Brdt (en violet) en complexe avec un nucléosome acétylé

hyperacétylée de H4 des autres formes portant des combinaisons différentes de lysines acétylées, comme la forme de H4 acétylée au niveau de K5 et K12 lors de l'assemblage des nucléosomes. De manière remarquable, les conclusions de ces études structurales sur les propriétés du BD1 de Brdt ont été confirmées *in vivo* au cours d'une étude indépendante utilisant une approche FRET [7]. Tenant compte de l'ensemble de ces résultats, il est possible de prédire que Brdt devrait principalement agir dans les spermatides en elongation au moment où les formes hyperacétylées de H4 apparaissent massivement avant le remplacement des histones (Figure 2). Ces prédictions concordent parfaitement avec le phénotype observé chez les souris qui expriment une protéine Brdt délétée de son BD1. Les données publiées montrent que les mâles homozygotes sont stériles avec des défauts majeurs touchant les spermatides, alors que toutes les étapes précédentes semblent se dérouler normalement [8]. Les analyses plus poussées de la spermatogenèse chez ces souris montrent que les anomalies apparaissent précisément lors des étapes qui suivent la vague d'hyperacétylation de la chromatine lors de l'elongation des spermatides (données non publiées). ♀

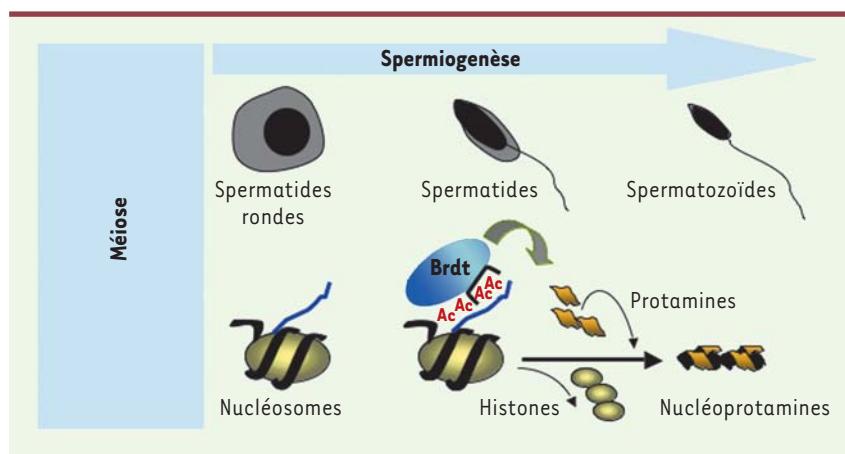


Figure 2. Rôle critique de Brdt dans le contrôle des transitions structurales du génome mâle haploïde. La vague d'acétylation touchant le génome des spermatides donne le signal pour le remplacement des histones par les protéines de transitions et les protamines. Brdt interagissant spécifiquement avec les formes hyperacétylées de l'histone H4 apparaît comme un facteur essentiel dans les transitions structurales qui suivent cette hyperacétylation.

Conclusions

La dissection structurale et fonctionnelle de Brdt a permis de montrer que la vague d'hyperacétylation de la chromatine a une fonction clé dans le déroulement de la spermatogenèse et désigne Brdt comme un acteur principal, capable de traduire cette hyperacétylation en une suite d'évènements indispensables pour la maturation des spermatides. D'autres recherches sont cependant nécessaires pour déterminer les conséquences de l'interaction de Brdt avec la chromatine hyperacétylée et de quelle manière les étapes qui suivent cette interaction sont contrôlées par Brdt.

Dans le contexte plus large du « code épigénétique », les données structurales obtenues sur Brdt ont révélé un nouveau

mode de lecture du « code histone », et mis en évidence une action sur la chromatine strictement dépendante d'une combinaison précise de marques épigénétiques, et dans ce cas, de l'apparition de la forme hyperacétylée de H4. ♦

A novel key element in post-meiotic male genome reprogramming

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. Govin J, Berger SL. Genome reprogramming during sporulation. *Int J Dev Biol* 2009 ; 53 : 425-32.
2. Govin J, Caron C, Lestrat C, et al. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermatogenesis. *Eur J Biochem* 2004 ; 271 : 3459-69.
3. Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* 2008 ; 7 : 3499-502.
4. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, et al. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 5354-65.
5. Morinier J, Rousseaux S, Steuerwald U, et al. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 2009 ; 461 : 664-8.
6. Zhang K, Williams KE, Huang L, et al. Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2002 ; 1 : 500-8.
7. Sasaki K, Ito T, Nishino N, et al. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 16257-62.
8. Shang E, Nickerson HD, Wen D, et al. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007 ; 134 : 3507-15.
9. Rousseaux S, Reynoard N, Gaucher J, Khochbin S. Intrusion of male epigenome regulators in somatic cancer cells. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 735-41.



Mutations de novo de *syngap1* associées à la déficience intellectuelle non syndromique

Fadi F. Hamdan, Julie Gauthier,
Guy A. Rouleau, Jacques L. Michaud

La déficience intellectuelle (DI) constitue le handicap sévère le plus fréquent de l'enfance, et touche 1-2 % de la population. Elle se traduit par un fonctionnement intellectuel significativement inférieur à la moyenne accompagné de difficultés importantes d'adaptation (communication, soins personnels, compétences domestiques, habiletés sociales, aptitudes scolaires et fonctionnelles, etc.) et survient avant l'âge de 18 ans [1]. La forme la plus répandue est la DI non syndromique (DINS), qui n'est associée à aucune autre anomalie. En l'absence de signes physiques qui orientent les chercheurs dans leurs explorations, l'identification des gènes autosomiques dominants associés à la DINS représente un défi particulier. Les familles dans lesquelles la DI est transmise sur le mode autosomique dominant sont rares en raison d'un taux de reproduction inférieur à celui de la population générale. Ces mutations autosomiques dominantes pourraient par contre survenir *de novo* (c'est-à-dire n'être pas héritées des parents). De fait, les remaniements chromosomiques *de novo* représentent la cause génétique de DI la plus fréquemment identifiée. Des mutations ponctuelles *de novo* pourraient elles aussi contribuer au développement de la DINS. La détection de ces mutations doit reposer sur leur recherche directe par séquençage.

Processus cognitifs et plasticité synaptique : cibles de la déficience intellectuelle non syndromique

Les processus cognitifs, comme la mémoire et les apprentissages,

s'accompagnent d'un remodelage des synapses excitatrices qui se caractérise par des changements de leur force, de leur nombre et de leur forme. Le terme « plasticité synaptique » est utilisé pour désigner ces différents changements. Les synapses excitatrices prennent la forme d'épines faisant saillie sur les dendrites des neurones. Comme la DI affecte les processus cognitifs, il n'est pas surprenant que le nombre et/ou la forme des épines soient altérés dans plusieurs formes de DI [2]. En fait, il est raisonnable de postuler qu'un grand nombre de gènes atteints dans la DI agissent au sein de cascades qui convergent pour moduler la plasticité des synapses. Il est aussi possible que les gènes contrôlant la plasticité synaptique jouent un rôle plus important dans la DINS que dans la DI syndromique. En effet, cette dernière forme de DI peut être associée à des anomalies structurales du cerveau, qui n'ont pas de lien avec des perturbations de la plasticité synaptique.

Les neurones présynaptiques associés aux épines dendritiques sécrètent le neurotransmetteur glutamate. La signalisation par le glutamate via le récepteur de type NMDA (NMDAR) est nécessaire à la plasticité des synapses excitatrices. Certaines formes de plasticité synaptique régulées par le NMDAR requièrent l'insertion du récepteur glutaminergique de type AMPA (AMPAR) dans la membrane post-synaptique. *SYNGAP1*, qui code pour une protéine activatrice de GTPase exclusivement exprimée dans le cerveau, agit en aval du NMDAR pour bloquer l'insertion

F.F. Hamdan, J.L. Michaud :
Centre d'excellence en neuromique
de l'Université de Montréal,
Centre de recherche du Centre hospitalier
universitaire Sainte-Justine,
Centre de recherche, CHU Sainte-Justine,
3175, Côte Sainte-Catherine,
Montréal (Québec), H3T 1C5 Canada.

jacques.michaud@recherche-ste-justine.qc.ca

J. Gauthier : Centre d'excellence
en neuromique de l'Université de Montréal,
Centre de recherche du Centre hospitalier
de l'Université de Montréal,
Montréal (Québec) H3T 1C5 Canada.

G.A. Rouleau : Centre d'excellence
en neuromique de l'Université de Montréal,
Centre de recherche du Centre hospitalier
universitaire Sainte-Justine,
Centre de recherche, CHU Sainte-Justine,
Montréal (Québec), H3T 1C5 Canada.

de AMPAR dans la membrane post-synaptique en inhibant la voie RAS-ERK (Figure 1) [3-5]. Le rôle de *SYNGAP1* pourrait être de restreindre dans le temps l'activation de RAS-ERK au cours de certaines phases de la plasticité synaptique. Les souris homozygotes pour un allèle nul de *Syngap1* meurent à la naissance tandis que les souris hétérozygotes survivent mais ont des perturbations de la mémoire et des apprentissages [3, 6].

Haplo-insuffisance de *SYNGAP1* à l'origine de déficience intellectuelle

L'hypothèse de notre groupe est que des mutations ponctuelles *de novo* touchant des gènes essentiels pour la plasticité synaptique pourraient expliquer une fraction des cas de DINS. Pour l'explorer, nous avons entrepris de séquencer un grand nombre de gènes intervenant dans le processus de plasticité synaptique dans une cohorte d'enfants atteints de DINS. Nous avons donné la priorité à l'étude de *SYNGAP1*, en raison de son importance pour la plasticité synaptique et la cognition chez la souris.

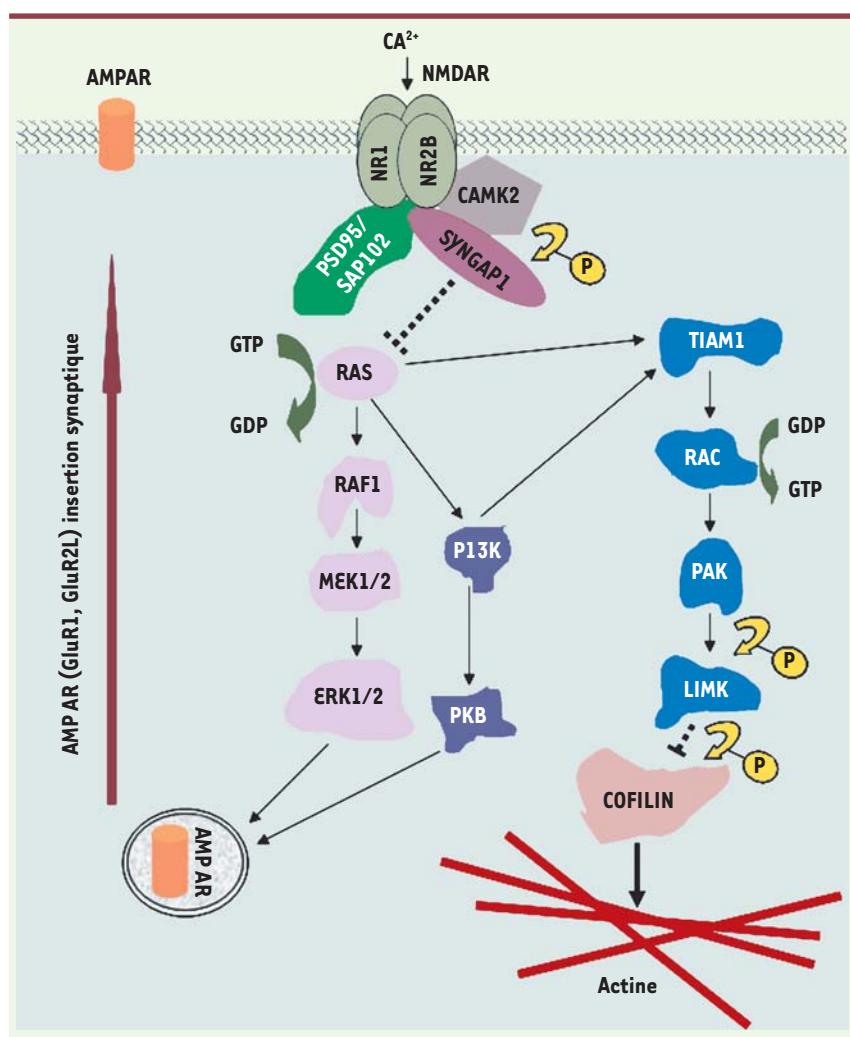


Figure 1. Fonction de SYNGAP1 dans la synapse.

SYNGAP1 agit en aval du récepteur glutaminergique de type NMDA pour restreindre l'activité de la voie RAS-ERK et l'insertion du récepteur glutaminergique de type AMPA dans la membrane au cours de certaines formes de plasticité synaptique. SYNGAP1 pourrait aussi influencer la morphologie des épines dendritiques en modulant la voie Rac et le remodelage du cytosquelette.

Conclusion et perspectives

La mise en évidence chez 3 % des patients testés de mutations dans *SYNGAP1* est inattendue car la plupart des gènes associés à une DI ont une prévalence de moins de 1 %. Par exemple, le syndrome de l'X fragile qui représente la cause monogénique de DI la plus fréquente, est détecté chez environ 2 % des individus masculins atteints de DI [8, 9]. Il sera donc important de valider la prévalence des mutations de *SYNGAP1* en séquençant le génome d'un grand nombre de patients porteurs des mêmes caractéristiques cliniques que celles des enfants étudiés dans notre étude.

SYNGAP1 représente un des premiers exemples de gènes autosomiques dominants associés à la DINS. Cette découverte aidera les cliniciens à établir un diagnostic étiologique de DI et facilitera le conseil génétique. De plus, la connaissance des gènes de DI impliqués dans les cascades synaptiques ouvre des perspectives futures de traitement pharmacologique de la DI, avec comme objectif de diminuer les anomalies associées comme l'épilepsie ou d'améliorer les performances cognitives. Finalement, notre étude valide l'approche de séquençage à haut débit pour l'exploration de maladies neurodéveloppementales. ♦

De novo mutations in *syngap1* associated with non-syndromic mental retardation

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

Le séquençage de la région codante de *SYNGAP1* chez 94 patients sporadiques atteints d'une DINS inexpliquée a permis de détecter 3 mutations *de novo* différentes dans *SYNGAP1* chez trois enfants [7]. Deux sont des mutations faux-sens ; la troisième est constituée d'une délétion d'un nucléotide qui entraîne un changement du cadre de lecture et l'introduction d'un codon stop prématûré. Les 3 enfants sont des filles, âgées de 4 à 12 ans, présentant une DI de gravité moyenne. Deux d'entre elles sont aussi traitées pour une épilepsie généralisée qui est facile à maîtriser.

Plusieurs observations suggèrent que ces mutations sont pathogéniques. D'abord, elles ont toutes comme conséquence d'amputer le domaine carboxy-terminal de *SYNGAP1* qui est requis pour

son interaction avec d'autres protéines du complexe du NMDAR. Ces interactions sont essentielles pour différents aspects de la plasticité synaptique qui sont associés à la mémoire et à l'apprentissage. Comme l'haploinsuffisance de *Syngap1* chez la souris affecte la plasticité synaptique et la mémoire spatiale, la perte d'un seul allèle de *SYNGAP1* a le potentiel de perturber la cognition chez l'humain. Finalement, le séquençage de *SYNGAP1* chez des individus autistes (n = 142), schizophrènes (n = 143) et sains (n = 190) n'a pas révélé de mutations *de novo*, ni de mutations potentiellement délétères [7]. Au total, ces observations suggèrent fortement que l'haploinsuffisance de *SYNGAP1* est une des causes de DINS.

RÉFÉRENCES

- Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, et al. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference: American College of Medical Genetics. *Am J Med Genet* 1997 ; 72 : 468-77.
- Purpura DP. Dendritic spine « dysgenesis » and mental retardation 1. *Science* 1974 ; 186 : 1126-8.
- Komiya NH, Watabe AM, Carlisle HJ, et al. SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 9721-32.
- Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Huganir RL. SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 4344-51.
- Carlisle HJ, Manzerra P, Marcra E, Kennedy MB. SynGAP regulates steady-state and activity-dependent phosphorylation of cofilin. *J Neurosci* 2008 ; 28 : 13673-83.
- Guo X, Hamilton PJ, Reish NJ, et al. Reduced expression of the NMDA receptor-interacting protein SynGAP causes behavioral abnormalities that model symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2009 ; 34 : 1659-72.
- Hamdan FF, Gauthier J, Spiegelman D, et al. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 599-605.
- Davidovic L, Tremblay S, Gravel M, et al. The fragile X syndrome: one protein missing and 1001 disoriented mRNAs. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 41-6.
- Billuart P, Chelly J, Gilgenkrantz S. X-linked mental retardation. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 947-53.

NOUVELLE

Elongator orchestre la neurogenèse du cortex cérébral

Catherine Creppe, Lina Malinouskaya, Marie-Laure Volvert, Pierre Close, Sophie Laguesse, Magali Gillard, Alain Chariot, Laurent Nguyen

L. Malinouskaya, M.L. Volvert, S. Laguesse, L. Nguyen : Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA-R), Developmental Neurobiology Unit, University of Liege, CHU Sart Tilman, Liège 4000, Belgique. C. Creppe, P. Close, M. Gillard, A. Chariot : Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA-R), GIGA Signal Transduction, Liège 4000, Belgique. alain.chariot@ulg.ac.be lnuygen@ulg.ac.be

Elongator, un rôle initial dans l'assemblage des ARNm

La dysautonomie familiale, ou syndrome de *Riley-Day*, est une maladie neurodégénérative héréditaire particulièrement représentée dans la population juive ashkénaze (une personne sur vingt-sept est porteuse de la mutation). Elle est caractérisée par sa transmission autosomale récessive et affecte notamment le développement et la survie de certains neurones des systèmes nerveux autonome et sensoriel. Les patients atteints de cette maladie présentent des troubles gastrointestinaux, des problèmes de déglutition, des crises de vomissements, d'hypotonie et d'instabilité thermique [1]. Ces patients sont également sujets à des crises dysautonomiques durant lesquelles certaines régions de leur cortex cérébral présentent une activité neuronale anormale [2].

La cause moléculaire de cette maladie est une mutation ponctuelle du gène *Ikbkap* (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein*) qui code pour la protéine Elp1 laquelle est requise pour l'assemblage du complexe Elongator. Ce dernier est composé de

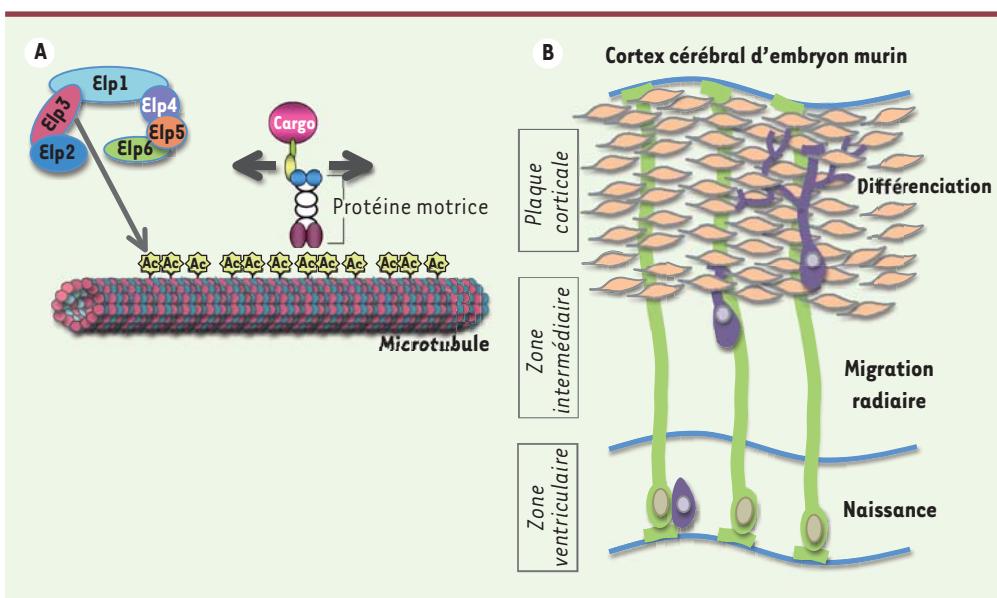
six sous-unités nommées Elp1 à Elp6. Il a été initialement décrit chez la levure comme interagissant avec la forme hyperphosphorylée de l'ARN polymérase II [3]. Les recherches qui ont suivi ont révélé qu'Elongator contribue à l'elongation de certains ARN messagers. En effet, le complexe Elongator, et plus particulièrement sa sous-unité Elp3, possède une activité histone acétyl-transférase envers l'histone H3, rendant ainsi possible la progression de l'ARN polymérase II au niveau de la région transcrète de certains gènes [4, 5]. Des études récentes ont démontré qu'Elongator remplit aussi des fonctions dans le cytoplasme, comme la régulation de l'exocytose et la modification de certains ARN de transfert [6, 7].

Elongator, la première enzyme responsable de l'acétylation de la tubuline alpha

Dans ce contexte, les travaux menés dans notre laboratoire ont révélé une nouvelle fonction du complexe Elongator durant la mise en place du cortex cérébral de souris. En effet, nos résultats montrent qu'Elongator coordonne la migration et la différenciation terminale des neu-

rones de projection du cortex cérébral via la promotion de l'acétylation de la tubuline alpha dans le cytoplasme [8]. Plus précisément, afin de caractériser les rôles d'Elongator au cours du développement cortical, nous avons utilisé la technique d'électroporation *in utero* et démontré que la réduction d'expression de Elp1 ou de Elp3 par ARN interférence dans le cortex cérébral d'embryon de souris entraîne un retard de migration des neurones de projection du cortex cérébral. De plus, ces neurones présentent des défauts permanents de formation de neurites caractérisés par une réduction de la longueur totale et une diminution de la complexité de l'arbre dendritique et des axones. L'intégrité du complexe semble par ailleurs requise pour ces fonctions puisque la coexpression d'une forme tronquée de Elp, qui n'interagit pas avec Elp3, ne corrige pas ce phénotype résultant de l'inhibition d'expression endogène d'Elp1 par ARN interférence.

Nous avons ensuite caractérisé la voie de signalisation moléculaire qui agit en aval d'Elongator afin de réguler la migration et la différenciation des neurones de projection corticaux. Nos



la gliale radiaire (vert) puis migrent le long des fibres radiaires afin d'atteindre la plaque corticale où ils se différencient et développent des dendrites et axones.

expériences ont non seulement révélé un enrichissement d'Elp1 dans les fractions microtubulaires de neurones corticaux, mais également une interaction entre la tubuline alpha, ou sa forme acétylée, et les sous-unités Elp1 et Elp3 d'Elongator. De plus, des cellules déficientes pour Elp1 ou Elp3 ont un taux réduit de tubuline alpha acétylée, suggérant que l'activité enzymatique du complexe Elongator est requise pour l'acétylation de la tubuline alpha. Nous avons finalement démontré qu'Elp3 possède une activité enzymatique acétyl-transférase intrinsèque envers la tubuline et, de ce fait, découvert la première enzyme responsable de l'acétylation de cette protéine.

Elongator, un partenaire essentiel du transport protéique dans les neurones ?

La réduction de l'acétylation des microtubules pourrait expliquer, en partie du moins, les défauts observés dans les neurones déficients pour Elongator. En effet, l'acétylation de la tubuline alpha favorise la liaison et la motilité de moteurs moléculaires comme les kinésines et le complexe dynéine/dynactine

sur le réseau microtubulaire de la cellule [9, 10]. Ces protéines transportent des molécules dites « cargo » le long des microtubules afin de les distribuer dans différents compartiments sub-cellulaires. Ce système de transport s'avère extrêmement important dans les cellules comme les neurones qui, par leur grande taille, posent un véritable défi à l'organisme pour l'organisation du transport intracellulaire [11]. Dès lors, nous suggérons que grâce à sa capacité d'acétyler la tubuline alpha, Elongator régulera indirectement le transport de protéines requises pour la motilité cellulaire et la différenciation des neurones corticaux.

L'ensemble de nos travaux suggère que certains aspects de la dysautonomie familiale pourraient être expliqués par un défaut de migration des cellules déficientes pour le complexe Elongator [4]. En effet, nous avons initialement montré une altération de la transcription de certains gènes importants pour la motilité cellulaire en présence d'un défaut d'acétylation des histones H3. Notre étude suggère maintenant que l'activité acétyl-transférase d'Elongator s'exerce également sur la tubuline

alpha. L'acétylation de ce nouveau substrat d'Elongator est une modification post-traductionnelle importante pour la migration des neurones de projection du cortex cérébral. Nos résultats n'excluent cependant pas l'existence de cibles cytoplasmiques supplémentaires d'Elongator, dont l'absence ou la réduction d'acétylation pourrait contribuer à la pathogenèse des patients atteints de dysautonomie familiale. ♦

Elongator orchestrates cerebral cortical neurogenesis

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Axelrod FB. Familial dysautonomia. *Muscle Nerve* 2004 ; 29 : 352-63.
- Slaugenhoupt 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.
- Otero G, Fellows J, Li Y, et al. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* 1999 ; 3 : 109-18.
- Close P, Hawkes N, Cornez I, et al. Transcription impairment and cell migration defects in elongator-depleted cells: implication for familial dysautonomia. *Mol Cell* 2006 ; 22 : 521-31.

5. Gilbert C, Kristjuhan A, Winkler GS, Svejstrup JQ. Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell* 2004 ; 14 : 457-64.
6. Huang B, Johansson MJ, Bystrom AS. An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* 2005 ; 11 : 424-36.
7. Rahl PB, Chen CZ, Collins RN. Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell* 2005 ; 17 : 841-53.
8. Creppe C, Malinovskaya L, Volvert ML, et al. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 2009 ; 136 : 551-64.
9. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 2007 ; 27 : 3571-83.
10. Reed NA, Cai D, Blasius TL, et al. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 2006 ; 16 : 2166-72.
11. Millecamp S, Julien JP. Dysfunction of axonal transport in neuropathies and motor neuron diseases. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 65-71.

NOUVELLE

Une cytokine chimérique au secours des maladies auto-immunes

Moutih Rafei, Jacques Galipeau

Bifonctionnalité synergique d'une cytokine chimérique GM-CSF - IL-2

Les cytokines, notamment le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) et le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), l'interféron (IFN)- α et l'interleukine-(IL) 2, sont régulièrement utilisées à des fins thérapeutiques en oncologie et, plus particulièrement, dans le traitement du mélanome et de l'hypernéphrome (ou cancer du rein à cellules claires) [1]. Par ailleurs, les interférons et les interleukines sont prisés pour leurs propriétés immunostimulatrices, utiles pour bloquer le développement des tumeurs et pouvant, à l'occasion, entraîner leur régression. Ces données nous ont amenés à proposer le concept selon lequel une cytokine chimérique née de la fusion de deux protéines immunostimulatrices distinctes - une fusokine douée d'une bifonctionnalité synergique - serait capable de stimuler simultanément les réponses immunes innées et adaptives. En effet, nous avons déjà démontré que la fusion du GM-CSF à l'IL-2 (GIFT2) confère à cette protéine des propriétés proinflammatoires [2]. Fort de ce succès, nous avons produit une fusokine GIFT de seconde génération mariant le GM-CSF à l'IL-15 (GIFT15). Comme l'IL-15 a été décrite comme stimulant fortement l'immunité innée, nous nous attendions à ce

que GIFT15 soit proinflammatoire. À notre grande surprise, son action s'est avérée plutôt fortement immunosuppressive [3]. En effet, une analyse de la fonctionnalité de GIFT15 a démontré que cette fusokine se lie au récepteur de l'IL-15 et déclenche une signalisation aberrante en aval caractérisée par une hyperactivation de STAT3 [3]. Toutes les cellules ayant un rôle dans l'immunité, qu'elles soient lymphoïdes ou myéloïdes, qui arborent le récepteur de l'IL-15 perdent leur capacité à participer à une réaction immune normale quand elles sont exposées à GIFT15. Ces effets ont été testés chez des souris possédant un système immunitaire intact et chez lesquelles des cellules tumorales humaines ont été greffées. Contrairement aux souris qui n'ont pas reçu de GIFT15, qui ont rejeté le greffon cellulaire, les animaux traités avec la fusokine ont toléré la greffe tumorale [3]. Ces résultats suggèrent que GIFT15 exerce une fonction suppressive de l'alloréactivité lors de greffes tissulaires non apparentées voire permet même de tolérer des xénogreffes.

Effet thérapeutique de la fusokine GM-CSF - IL-15 dans les maladies auto-immunes

Ce résultat prometteur nous a incités à tester l'effet de GIFT15 dans le

M. Rafei : Institut de recherche en immunothérapie du cancer, Université de Montréal, CP 6128, Succursale centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada.

J. Galipeau :
Division d'hématologie/oncologie, Hôpital général juif, Université McGill, 3755, chemin de la Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1E2 Canada.
jacques.galipeau@mcgill.ca.

traitement de maladies autoimmunes associées causées par l'activation de cellules T autoréactives. Tel est le cas de la sclérose en plaques [4]. Plusieurs stratégies sont utilisées dans le traitement de cette maladie : l'interféron β (IFN- β), l'acétate de glatiramère, le mitoxantrone et le natalizumab¹ [4, 11]. Toutefois, en dépit des résultats encourageants chez les patients, l'efficacité de ces thérapies est partielle, atténuant la progression de la maladie. Une approche de thérapie cellulaire (testée dans des modèles animaux) consiste à administrer des cellules suppressives telles que les cellules T régulatrices [5], qui peuvent exercer un effet suppressif persistant en provoquant la sécrétion, chez l'hôte, de facteurs inhibiteurs sans induire d'effets secondaires [5]. Les lymphocytes B suppresseurs (désignées aujourd'hui sous le nom de cellules B reg) possèdent aussi une excellente capacité à inhiber l'inflammation due à leur sécrétion d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire [6]. Par exemple, l'induction d'une encéphalite allergique

¹ Le glatiramère est un copolymère synthétique qui agirait sur les cellules de l'immunité, le mitoxantrone un immunosuppresseur, et le natalizumab ou Tysabri® un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la chaîne α 4 des intégrines et bloquant la migration des lymphocytes via la barrière hématoencéphalique.

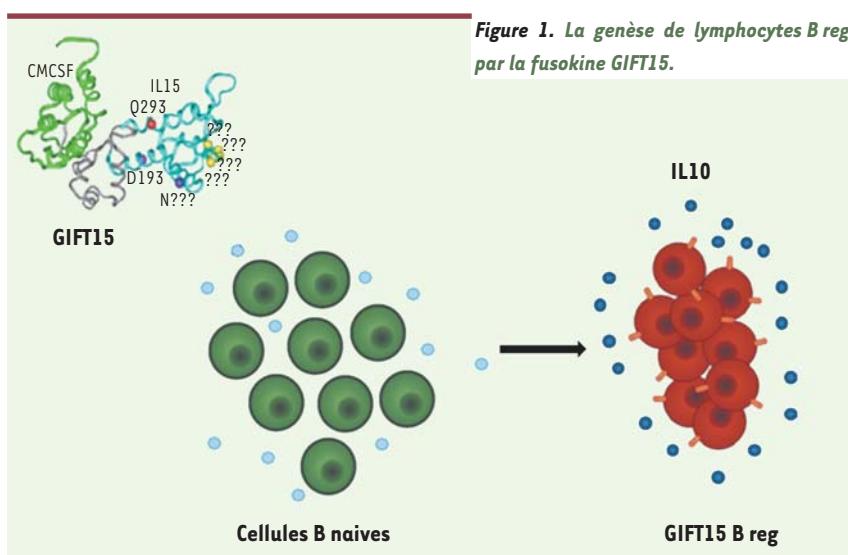


Figure 1. La genèse de lymphocytes B reg par la fusokine GIFT15.

expérimentale (EAE), un modèle animal de sclérose en plaque, chez des souris déficientes en lymphocytes B, entraîne une pathologie plus sévère que celle qui est observée chez des souris dont le nombre de lymphocytes B est normal [7]. Dans ce dernier cas, le transfert adoptif de lymphocytes B normaux chez ces souris a amélioré leur état clinique tandis que le transfert de cellules B déficientes en IL-10 n'a eu aucun effet thérapeutique [7]. Malheureusement, l'utilisation de cellules B reg chez l'homme est difficile car ces cellules sont présentes en très faible nombre chez l'humain. De plus, il n'existe actuellement aucune méthode permettant de les amplifier *in vitro* [8]. Nous avons observé que la fusokine chimère GIFT15

transforme les lymphocytes B naïfs en cellules suppressives B reg (Figure 1). Les cellules B reg exercent comme les cellules Treg mieux connues un rôle immuno-suppresseur, mais elles s'en distinguent par leur abondante production d'IL-10 [9]. L'idée d'utiliser GIFT15 pour amplifier une population de B reg qui pourrait être ensuite être administrée comme une thérapie cellulaire autologue nous paraissait séduisante, et nous avons testé cette stratégie et l'effet pharmaceutique des B reg ainsi obtenus dans un modèle murin de sclérose en plaque [9]. Une seule injection par voie intraveineuse d'un million de cellules B reg chez des souris souffrant d'encéphalite allergique entraîne une rémission complète et durable chez virtuellement toutes les

souris traitées (Figure 2). Cet effet clinique est toutefois dépendant et de la production d'IL-10 et de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II par les B reg [9].

Conclusion et perspectives

Nous avons montré que GIFT15 stimule la genèse *ex vivo* d'un produit cellulaire autologue dérivé de lymphocytes B qui possède un effet immunsupresseur important dans un modèle murin de sclérose en plaque. Rien n'interdit d'envisager que cette même plateforme pharmaceutique de thérapie cellulaire pourrait être fort utile en vue des traitements d'autres pathologies hyper-immunes comme le lupus, la maladie de Crohn, l'arthrite inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde) et le rejet immun d'allograftes. Une avancée conceptuelle importante réside dans l'observation que la création d'une fusokine chimérique résultant du mariage forcé de deux cytokines dotées de propriétés biochimiques distinctes aboutit à une protéine dont les effets biochimiques sont inattendus et contre-intuitifs ; d'autres molécules de ce type sont en cours de développement [10]. Ce type d'approche pharmacologique visant à confondre Dame Nature pourrait être fructueux pour la conceptualisation et la mise au point de molécules consœurs susceptibles de moduler l'immunité à des fins thérapeutiques. ♦

A chimeric cytokine for autoimmune diseases

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

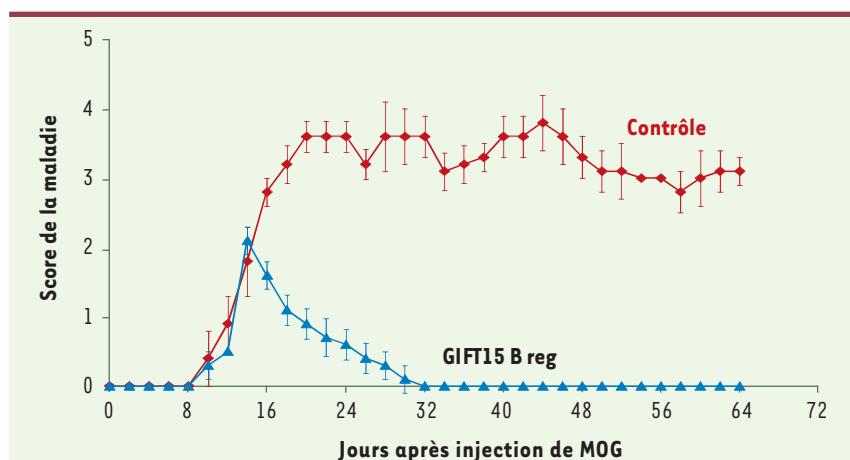


Figure 2. Effet thérapeutique des lymphocytes B reg. L'injection par voie intraveineuse de cellules B reg amplifiées *in vitro* par la fusokine GIFT15 bloque le développement de la pathologie immunitaire dans un modèle animal de sclérose en plaques. MOG : myelin oligodendrocyte glycoprotein.

RÉFÉRENCES

1. McDermott DF. Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 2009 ; 115 (Suppl 10) : 2298-305.
2. Stagg J, Wu JH, Bougamin N, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion of cDNA for cancer gene immunotherapy. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 8795-99.
3. Rafei M, Wu JH, Annabi B, et al. A GM-CSF and IL15 Fusokine Leads to paradoxical immunosuppression *in vivo* via asymmetrical JAK/STAT signaling through the IL15 receptor complex. *Blood* 2007 ; 109 : 2234-42.
4. Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004 ; 251 (suppl 5) : v12-29.
5. Stern JN, Keskin DB, Zhang H, et al. Amino acid copolymerspecific IL-10-secreting regulatory T-cells that ameliorate autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 5172-6.
6. Neta R, Salvio SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol* 1974 ; 113 : 1716-25.
7. Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 944-50.
8. Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 2008 ; 224 : 201-14.
9. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, et al. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med* 2009 ; 15 : 1038-45.
10. Rafei M, Campeau PM, Wu JH, et al. Selective inhibition of CCR2 expressing lymphomyeloid cells in experimental autoimmune encephalomyelitis by a GM-CSF-MCP1 fusokine. *J Immunol* 2009 ; 182 : 2620-7.
11. Papeix C, Lubetzki C. Anticorps monoclonaux dans la sclérose en plaques. *Med Sci* 2009 ; 25 : 1113-5.

NOUVELLE

Épissothérapie et thalassémies

Dominique Labie, Jean-Claude Kaplan

D. Labie : Département de génétique, développement et pathologie moléculaire, Inserm U567, Université Paris V René Descartes, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
dominique.labie@inserm.fr

J.C. Kaplan : Institut Cochin, Université Paris V René Descartes, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
kaplan@cochin.inserm.fr

► La manipulation thérapeutique de l'épissage permet de rétablir au niveau de l'ARN messager mûr un cadre de lecture interrompu par un défaut génomique quelconque. Ce rétablissement peut être notamment obtenu par saut d'exon (*exon skipping*), ou par neutralisation d'un site d'épissage aberrant. Dans les deux cas les effecteurs utilisés sont des oligonucléotides antisens (AON pour *antisense oligonucléotides*) complémentaires des sites à neutraliser. Cette stratégie de reprogrammation des ARN prémessagers, proposée dès 1993 par Ryszard Kole (Chapel Hill) [1], n'a progressé que lentement au fil des années. Pendant plus de dix ans les preuves expérimentales de concepts *in vitro* et *ex vivo* se sont accumulées [2], sans être concrétisées par des essais cliniques. On assiste depuis quelques années à une accélération des progrès, essentiellement liés à : (1) une optimisation de la chimie des AON et de leur adressage [2, 3] ; (2) une rationalisation du choix des cibles [4] ; (3) un approfondissement des connaissances sur l'épissage normal et pathologique [5]. En raison de la structure modulaire éminemment favorable du gène *DMD* (*Duchenne muscular dystrophy*) et de

la dystrophine, c'est l'épissothérapie par saut d'exon des dystrophinopathies (myopathies de Duchenne/Becker) qui est la plus avancée expérimentalement *in vivo* [6, 7] et qui a donné lieu aux premiers essais cliniques [8, 9]. *A priori* l'épissothérapie des bêta-thalassémies ne relève pas du saut d'exon, car ni la structure du gène de la bêta-globine (*HBB*) ni sa pathologie ne s'y prêtent. Cependant, il est des variants où la rupture du cadre de lecture résulte de mutations créant des néosites d'épissage [10]¹. Ici le retour à un patron d'épissage normal pourrait être obtenu en masquant ces sites par des AON ciblés. Plusieurs articles récents font état de preuves de concept enfin obtenues *in vivo* dans un modèle murin [11, 12] et laissent espérer une possible application en clinique.

Les bêta-thalassémies

Ce sont sans doute les maladies génétiques les plus fréquentes au monde. Elles résultent de mutations très diverses, et au moins 200 mutations diffé-

rentes ont été décrites [13], entraînant un déficit partiel ou total de synthèse des chaînes de bêta-globine dont les conséquences cliniques sont de gravité variable [10]. L'abord thérapeutique est le plus souvent un régime transfusionnel à vie, combiné à des chélateurs. La greffe de moelle osseuse, seul traitement correcteur, est d'usage limité (coût, rareté des donneurs, risques inhérents). Les espoirs fondés sur la réactivation du gène *HBF* codant l'hémoglobine fœtale ont été déçus [10] et la thérapie génique « classique » des hémoglobinopathies n'a pas encore fait ses preuves en clinique [14]. En matière d'épissothérapie, nous avons vu que seules peuvent être retenues celles des bêta-thalassémies qui résultent de l'activation mutationnelle d'un site cryptique d'épissage (*Tableau 1*). Si le nombre des mutations de ce type est limité, leur incidence épidémiologique n'est pas négligeable, car elle concerne au moins 10 % des patients atteints d'une pathologie de l'hémoglobine. Parmi les mutations candidates à une épissothérapie, celles qui siègent dans l'IVS2 (*intervening sequence 2*) représentent un modèle particulièrement intéressant et c'est sur lui que se sont

¹ Il faut les distinguer des mutations exoniques ou juxta-exoniques affectant les sites consensus d'épissage (donneurs, accepteurs, activateurs, branchement) qui ne sont pas encore accessibles à l'épissothérapie dont il est question ici.

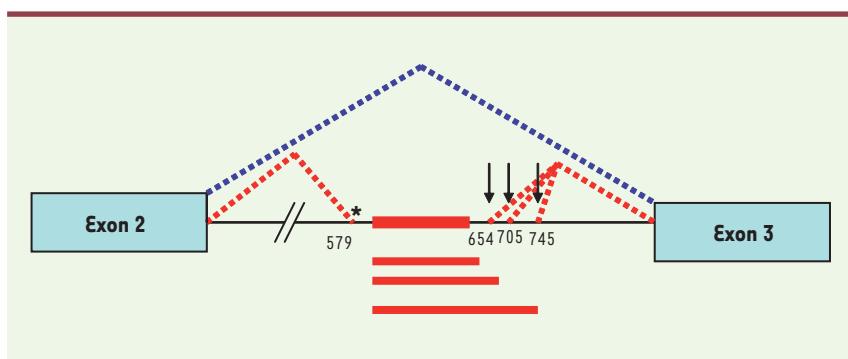


Figure 1. Schéma de l'épissage au niveau du deuxième intron de la β -globine. L'épissage normal est figuré en bleu. Les épissages aberrants sont figurés en rouge. Les flèches verticales indiquent le site des mutations qui toutes trois créent un site accepteur. L'étoile indique le site récepteur cryptique, le même activé par les trois mutations. Le résultat de ces épissages aberrants est l'inclusion d'un pseudo-exon, de taille variable selon la mutation, et un décalage de la phase de lecture de l'ARN.

concentrés les efforts. En effet, les mutations aux nucléotides 654, 705 et 745 sont toutes trois créatrices d'un site donneur, et activent toutes trois un même site cryptique accepteur situé au nucléotide 579 (Figure 1). Le résultat est l'inclusion dans le préARNm d'un pseudo-exon, de taille variable qui, dans les trois cas, interrompt le cadre de lecture. La mutation IVS2-654 a été le modèle le plus étudié, à cause de sa très grande fréquence en Chine et en Asie du Sud-Est [11]. Si elle n'engendre pas un phénotype nul (b0-thal), c'est parce qu'il existe un phénomène d'échappement avec utilisation très minoritaire des sites normaux [15]. La première tentative de correction du transcript primaire à l'aide d'un AON spécifique remonte à 1993 [1]. Les auteurs avaient obtenu la restauration d'un épissage correct en ciblant en système acellulaire, soit le site 5' nouvellement créé, soit le site 3' cryptique activé. Dans les années suivantes, le bien-fondé de cette approche a été vérifié expérimentalement dans des systèmes cellulaires : cellules HeLa, puis précurseurs érythroïdes de sujets thalassémiques [16-19]. Le passage à l'expérimentation animale *in vivo* a été franchi grâce à des souris transgéniques dont un des deux locus bêta globine avait été remplacé par le locus bêta humain portant la mutation IVS2-654 [20]. Ces animaux sont hétérozygotes pour la mutation dans un contexte humain (l'homoygotie serait létale). Bien qu'hétérozygotes, ces souris dites

Hbb^{th-4}/Hbb^+ présentent un phénotype thalassémique. Elles n'expriment pas d'HbA humaine. Après une série d'expériences effectuées *ex vivo* [17], une équipe de Shanghai a enfin apporté la preuve d'un effet bénéfique clinique et biologique de l'épissothérapie sur animal entier [11]. Ce résultat a été obtenu chez des souris Hbb^{th-4}/Hbb^+ [20] ayant intégré, par transgenèse dans des ovocytes fécondés, un vecteur lentiviral à double effet, portant à la fois une séquence codant l'AON spécifique de la mutation humaine IVS2-654, et une séquence codant un shARN (sh : *short hairpin*) destiné à diminuer l'excès d'ARNm de la chaîne alpha globine. Même si cette ingénieuse prouesse expérimentale apportait la première preuve de concept d'un effet thérapeutique *in vivo*, on était encore loin d'une stratégie applicable en clinique. Le travail récent de l'équipe de Chapel Hill [12] franchit un pas décisif puisqu'elle obtient un effet clinique avec synthèse d'HbA par un traitement somatique. Des souris Hbb^{th-4}/Hbb^+ [20] ont reçu pendant 3 semaines (4 jours consécutifs, 3 jours d'arrêt) par injection intraveineuse (25 mg/kg) un oligonucléotide antisens long de 18 nt dirigé contre la mutation IVS2-654 (Figure 1). L'AON utilisé est un dérivé phosphorodiamidate morpholino conjugué à un peptide chargé positivement (« SSO 654-P005 » dont la composition n'est pas révélée) destiné à favoriser la pénétration nucléaire. Par comparaison avec les témoins traités par un AON non spé-

cifique on a constaté la restauration de l'épissage normal (x 6) et sa traduction en HbA (environ 10 %), ainsi que la présence d'hémoglobine chimère souris(m)-homme(h) ($\alpha\alpha^2\beta\beta^2$). On observait en même temps une remontée du taux global d'hémoglobine et une amélioration morphologique des globules rouges. L'interprétation quantitative doit tenir compte de deux facteurs : (1) les souris étant hétérozygotes, seul un allèle a été corrigé ; (2) la durée de vie des globules rouges murins étant d'environ 100 jours, un traitement de trois semaines n'a pu corriger que moins du tiers des cellules. La valeur observée de 10 % d'HbA est donc proche de la valeur théorique. Aucun signe de toxicité hépatique ou rénale n'a été constaté, ni des signes de stimulation immunitaire (absence d'anticorps spécifiques, pas de stimulation des lymphocytes).

Perspectives

Les autres mutations responsables de thalassémies (Tableau I)

On pourrait envisager d'élargir le domaine d'application aux thalassémies fréquentes comme celle que cause la mutation IVS1-110, très répandue dans le bassin méditerranéen oriental (Grèce, Chypre, Liban, Turquie, Égypte) [10]. C'est une thalassémie sévère dont la prise en charge thérapeutique est médicalement et économiquement très lourde. À la lumière des progrès des connaissances et des méthodologies, les premiers résultats peu concluants

Localisation de la mutation	Mutation	Conséquence moléculaire**	Géographie	Remarques
Mutations introniques				
IVS1	110 G > A	Création d'un site accepteur aberrant	Bassin méditerranéen	Fréquente et grave
	116 T > G	Création d'un site accepteur aberrant		
IVS2	654 C > T*	Création d'un pseudo-exon	Chine	Fréquente et grave
	705 T > G	Création d'un pseudo-exon	Bassin méditerranéen	Sporadique
	745 C > G	Création d'un pseudo-exon	Bassin méditerranéen	Assez fréquente
	837 T > G	Création d'un pseudo-exon (théorique)	Inde	
Mutations exoniques				
	Codon 10 : GGC > GCA	Activation d'un site cryptique (théorique)	Inde	
	Codon 19 : AAC > AGC	Activation d'un site cryptique donneur dans le codon 18	Malaisie	Hb Malay
	Codon 24 : GGT > GGA	Activation d'un site cryptique donneur dans le codon 25	Afro-Américains	
	Codon 26 : GAG < AAG	Activation d'un site cryptique donneur dans le codon 25		Asie
	Codon 27 : GCC > TCC	Activation d'un site cryptique donneur dans le codon 25	Bassin méditerranéen	Hb Knossos

Tableau I. Principales mutations du gène HBB génératrices de bêta-thalassémie accessibles à une épissothérapie par masquage du site aberrant.

* Mutation traitée dans l'article de Svasti et al. (2009) [12]. ** Expérimentalement prouvée dans tous les cas sauf ceux indiqués en italique. Les meilleurs candidats à l'épissothérapie sont les mutations créant un pseudo-exon au sein d'un intron (sur fond coloré). Les mutations exoniques peuvent activer un site cryptique donneur résident, soit au codon 18, soit au codon 25. Leur masquage par AON n'a pas encore donné lieu à publication.

obtenus en systèmes acellulaires en 1993 [1] pourraient être reconsidérés ; notamment en essayant d'atteindre d'autres cibles que la mutation elle-même (point de branchement, séquences régulatrices d'épissage). L'hémoglobinoïde E avec son épissage anormal (site donneur anormal créé au codon 26 de l'exon 1) est presque toujours assez bénigne. Cependant l'hétérozygotie composite avec une autre mutation thalassémique entraîne un phénotype sévère qui justifierait son ciblage. D'autres mutations thalassémiques perturbant l'épissage normal sont potentiellement justifiables d'une épissothérapie et méritent l'attention.

Les AON vectorisés

L'action sur le préARNm des AON administrés tels quels est de courte durée et implique pour les maladies génétiques un apport régulier dont on ignore pour l'instant la fréquence optimale et l'éventuelle toxicité à long terme. C'est pourquoi on a en parallèle tenté d'obtenir une production permanente *in situ* des AON correcteurs grâce à des constructions camouflées dans une séquence naturelle d'ARN nucléolaire ou snARN, en particulier la séquence U7, et incorporées dans un vecteur viral [21]. Cette stratégie a déjà fait la preuve expérimentale de son efficacité prolongée pour le saut d'exon thérapeutique dans un modèle murin de dystrophinopathie [22],

[23]. Mais ici, la nécessité de recourir à un vecteur viral représente encore un obstacle pour le passage aux essais cliniques. En attendant, à la lumière des résultats obtenus d'abord dans les dystrophinopathies [8, 24], et maintenant dans certaines formes de thalassémie [12], c'est l'administration systémique d'AON qui porte les espoirs thérapeutiques les plus immédiats. ♦

Update on RNA splicing repair: applications to beta thalassemia and other perspectives

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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



RÉFÉRENCES

1. Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8673-77.
2. Bauman J, Jearawiriyapaisarn N, Kole R. Therapeutic potential of splice-switching oligonucleotides. *Oligonucleotides* 2009 ; 19 : 1-14.
3. Lebleu B, Moulton HM, Abes R, et al. Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 ; 60 : 517-29.
4. Aartsma-Rus A, Van Vliet L, Hirsch M, et al. Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol Ther* 2009 ; 17 : 548-553.
5. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1792 : 14-26.
6. Van Ommen GJ, van Deutekom J, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr Opin Mol Ther* 2008 ; 10 : 140-9.
7. Yokota T, Takeda S, Lu QL, et al. A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Arch Neural* 2009 ; 66 : 32-8.
8. Van Deutekom JC, Janson AA, Ginjala IB, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 2007 ; 357 : 2677-86.
9. Kinali M, Arechavala-Gomeza V, Feng L, et al. Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *The Lancet Neurology* 2009 ; 8 : 918-28.
10. Forget BG. Molecular mechanisms of beta-thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of hemoglobin*. Cambridge : Cambridge University Press 2001 : 252-66.
11. Xie SY, Ren ZR, Zhang JZ, et al. Restoration of the balanced alpha/beta-globin gene expression in beta 654-thalassemia mice using combined RNAi and antisense RNA approach. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 2616-25.
12. Svasti S, Suwanmanee T, Fuhrer, S, et al. RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2-654 thalassemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 1205-10.
13. HbVar. <http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>.
14. Hayakawa J, Ueda T, Lisowski, et al. Transient in vivo beta-globin production after lentiviral gene transfer to hematopoietic stem cells in the nonhuman primate. *Hum Gene Ther* 2009 ; 20 : 563-72.
15. Huang SZ, Zeng FY, Ren ZR, et al. RNA transcripts of the beta-thalassaemia allele IVS-2-654 C->T: a small amount of normally processed beta-globin mRNA is still produced from the mutant gene. *Br J Haematol* 1994 ; 88 : 541-6.
16. Lacerra G, Sierakowska H, Carestia C, et al. Restoration of hemoglobin A synthesis in erythroid cells from peripheral blood of thalassemic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 9591-6.
17. Gong L, Gu XF, Chen YD. Reversal of aberrant splicing of beta-thalassaemia allele (IVS-2-654 C->T) by antisense RNA expression vector in cultured human erythroid cells. *Br J Haematol* 2000 ; 111 : 351-8.
18. Suwanmanee T, Sierakowska H, Lacerra R, et al. Restoration of human beta-globin gene expression
- in murine and human IVS2-654 thalassemic erythroid cells by free uptake of antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 2002 ; 62 : 545-53.
19. Vacek MM, Ma H, Gemignani F, et al. High-level expression of hemoglobin in a human thalassemic erythroid progenitor cells following lentiviral vector delivery of an antisense snRNA. *Blood* 2003 ; 101 : 104-11.
20. Lewis J, Yang B, Kim R, et al. A common human beta globin splicing mutation modeled in mice. *Blood* 1998 ; 91 : 2152-6.
21. Gorman L, Suter D, Emerick V, et al. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 4929-34.
22. Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004 ; 306 : 1796-9.
23. Benchaour R, Meregalli M, Farini A, et al. Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 2007 ; 1 : 646-57.
24. Yokota T, Lu QL, Partridge, et al. Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 2009 ; 65 : 667-76.
25. Kaplan JC, Chelly J, Garcia L. Effective exon skipping in humans: a symbolic but promising jump into DMD therapy. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 215-7.
26. Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, et al. An opening in Duchenne muscular dystrophy: persistent therapeutic rescue of dystrophin by vectorized antisense mediated exon skipping in mdx mice. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 1163-5.

NOUVELLE

La chromatine façonne le fuseau mitotique

Céline Pugieux, François Nédélec

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (EMBL), Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Allemagne. nedelec@embl.de

► Les microtubules (fibres de tubuline) sont l'un des constituants majeurs du squelette de la cellule. Leur autoassemblage présente une dynamique particulière qui permet à la cellule de répondre rapidement aux signaux intra- et extracellulaires. Ils sont nécessaires, entre autres, au transport cytoplasmique, à la migration et à la division cellulaires. Des composés, comme le taxol ou le doce-taxel, sont utilisés en chimiothérapie contre certains cancers, car, en perturbant la dynamique des microtubules, ils permettent de cibler les cellules qui se divisent.

Fuseau mitotique : **symétrie en miroir mais forme variable**
 Pour se diviser, la cellule eucaryote génère et organise des microtubules en une structure symétrique bipolaire, appelée fuseau mitotique [8]. Le rôle d'un tel fuseau est de répartir les chromosomes équitablement afin de prévenir toute aneuploïdie (un nombre abnormal de chromosomes) dans les cellules filles. Pour accomplir cette tâche, un fuseau doit être symétrique : il faut qu'il soit invariant par une symétrie miroir suivant un plan qui le partage en son milieu. Au plan moléculaire, cette symé-

trie correspond à des chevauchements antiparallèles entre microtubules dans la région centrale du fuseau, créés par des molécules qui organisent et lient les microtubules entre eux. Si - sauf rares exceptions - tous les fuseaux sont bien symétriques, leur forme est par contre variable. Chez les animaux, les fuseaux mitotiques ressemblent à des losanges ; les deux extrémités pointues, appelées pôles, sont situées symétriquement de chaque côté du plan de symétrie. Les pôles sont, en partie, organisés par les centrosomes, mais ces organites ne sont pas essentiels à la formation d'un fuseau

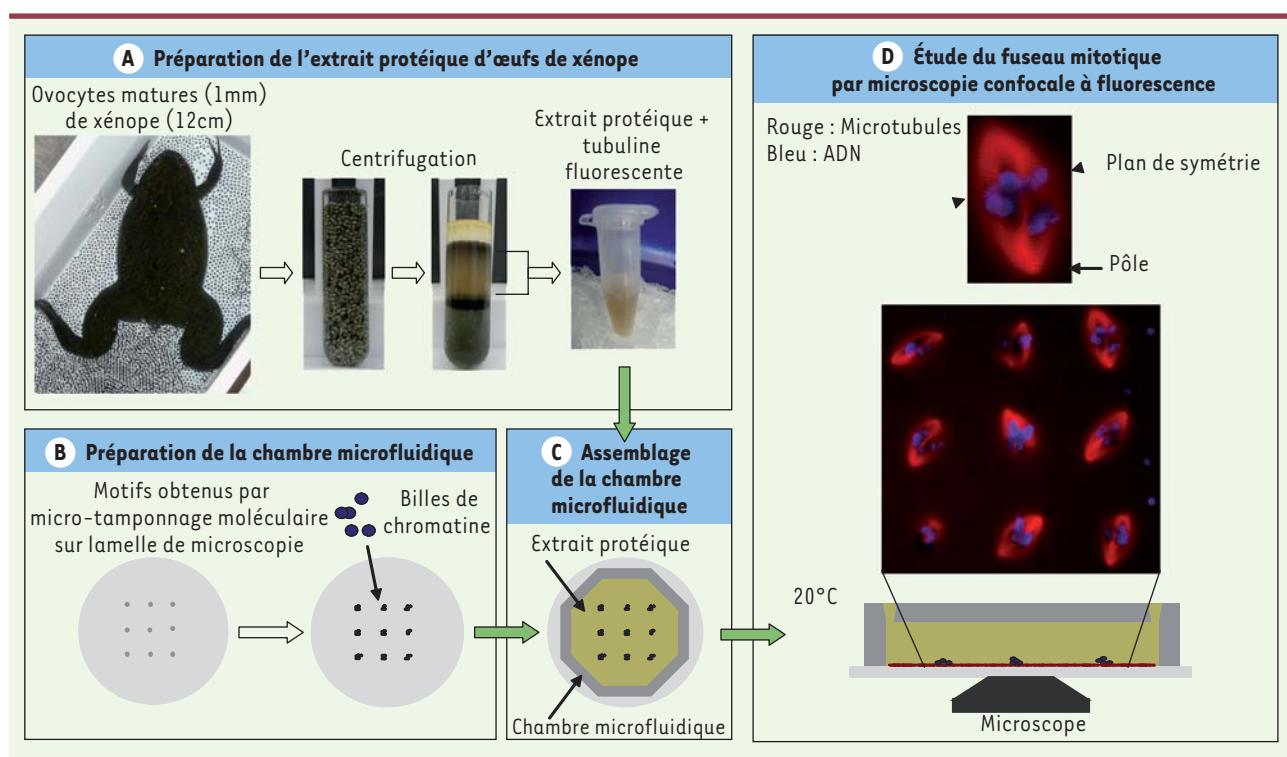


Figure 1. Formation de fuseaux mitotiques in vitro. **A.** Un extrait protéique est préparé à partir d'œufs de xénopé. Les œufs sont collectés ; leur enveloppe de protection gélatineuse est dissoute ; ils sont centrifugés. La fraction cytosolique est alors collectée puis conservée sur glace. **B.** Des billes de chromatine sont fixées à un motif obtenu par micro tamponnage moléculaire. **C.** L'ensemble est ensuite enfermé dans une chambre microfluidique en polymère. Cette chambre est alors remplie avec l'extrait protéique fraîchement préparé, contenant de la tubuline fluorescente (pour visualiser les microtubules) ainsi qu'un marqueur d'ADN. **(D)** Le résultat est visualisé à l'aide d'un microscope confocal thermorégulé à 20°C.

mitotique. Quant aux fuseaux de cellules végétales, ils ont une forme rectangulaire, sans pôles et sans centrosomes. Enfin, en plus de ces considérations de symétrie et de forme, un fuseau mitotique est aussi caractérisé par sa taille (longueur, largeur) qui varie d'un organisme à un autre, ou d'un type cellulaire à un autre.

Le rôle de la chromatine dans la nucléation des microtubules

Les recherches récentes ont permis d'éclairer les mécanismes de formation du fuseau mitotique. On comprend mieux comment les microtubules sont générés lorsque la cellule entre en phase mitotique, et les protéines qui organisent les microtubules ont été identifiées. Parmi celles-ci, les moteurs moléculaires comme les kinésines et la dynéine sont des acteurs essentiels. Ce sont des

motrices miniatures qui se déplacent de manière directionnelle le long des microtubules en utilisant l'ATP comme source d'énergie. En particulier, une kinésine importante appelée Eg5 forme les ponts qui organisent les chevauchements antiparallèles des microtubules. La dynéine est aussi une motrice, mais elle se déplace sur les microtubules dans le sens opposé par rapport à Eg5. Elle participe à l'organisation des pôles du fuseau dans les cellules animales. Les ovocytes matures non fertilisés (communément appelés œufs) de la grenouille *Xenopus laevis* sont naturellement arrêtés en métaphase 2 de la méiose et organisent leurs fuseaux en l'absence de centrosomes [9]. Ce système a permis de démontrer que le fuseau se forme autour de l'ADN car la chromatine génère la majorité des microtubules [1]. Cette nucléation

spatialement restreinte est la conséquence de la phosphorylation locale d'une petite protéine appelée Ran par une kinase associée à la chromatine [2]. Pour obtenir leurs résultats, Heald *et al.* avaient utilisé des billes, d'un diamètre de 2,8 µm, recouvertes d'ADN. L'ADN, une fois incubé dans un extrait d'œufs de xénopé, s'organise en chromatine et est ainsi capable d'induire la formation de fuseaux mitotiques. Notre approche a été similaire [1] mais une étape supplémentaire de microfabrication nous a permis de contrôler l'adhésion des billes, et de choisir ainsi la géométrie de la chromatine autour de laquelle les fuseaux se forment. Il ne restait plus qu'à corrélérer la quantité et la géométrie de la chromatine avec la symétrie et les dimensions des fuseaux mitotiques, pour apprendre comment la chromatine « façonne » le fuseau

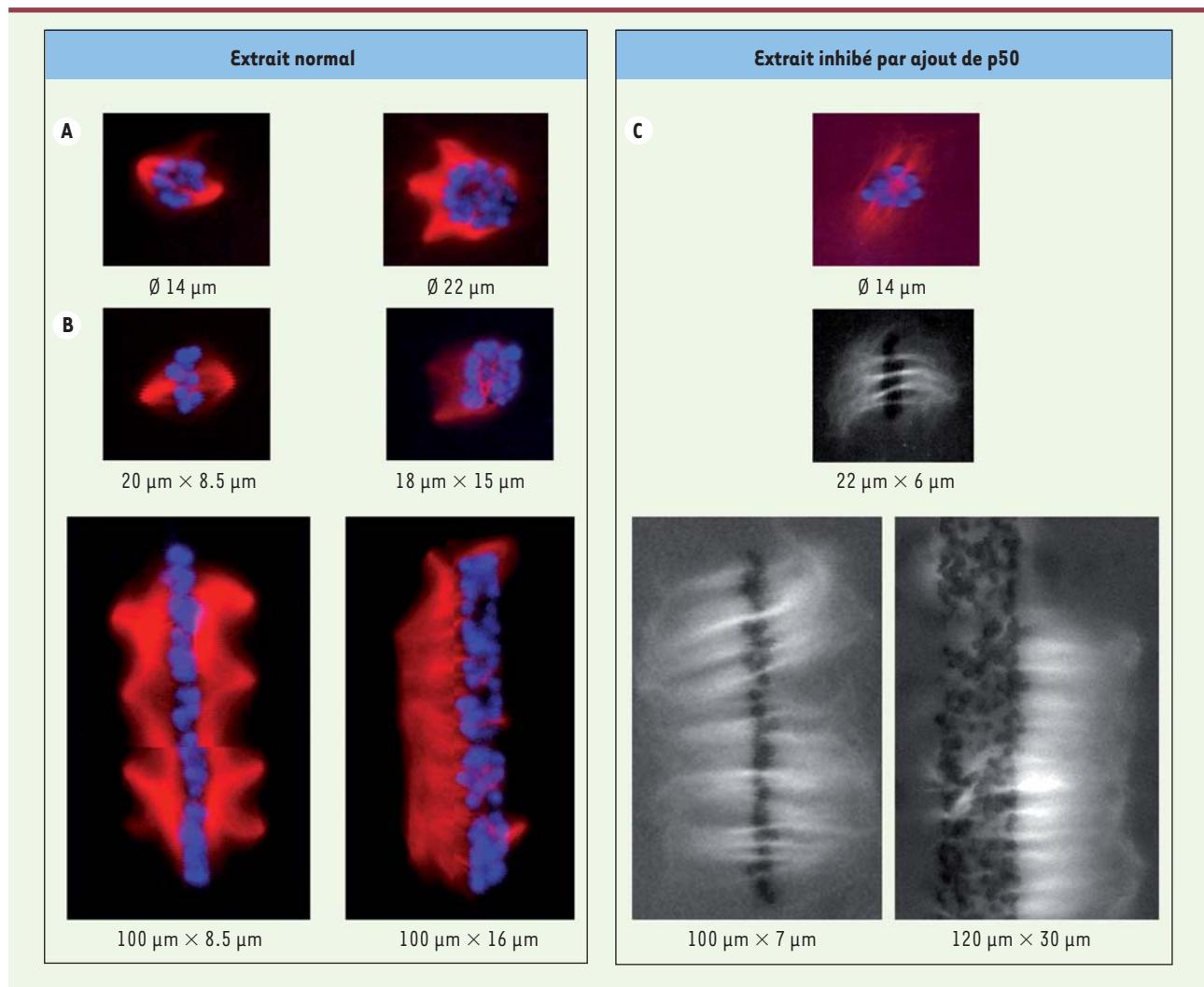


Figure 2. Fuseaux mitotiques obtenus sur différents motifs de chromatine. Fuseaux et autres structures sont obtenus sur des motifs circulaires (A) et rectangulaires (B) de différentes dimensions (bleu : ADN, rouge : microtubules). (C) Structures obtenues sur les mêmes motifs de chromatine, mais en présence d'un inhibiteur de la dynéine, ce qui empêche la formation de pôles (couleurs comme A et B. Les images en noir et blanc ne montrent que les microtubules, mais l'ombre des billes est visible).

mitotique [3]. En pratique, le motif de chromatine obtenu par microtamponnage est enfermé dans une chambre microfluidique qui est remplie d'extrait protéique. La formation des fuseaux est observée par microscopie confocale (Figure 1).

Influence de la géométrie de la chromatine sur la symétrie des fuseaux : démonstration expérimentale

Le dispositif expérimental fut validé avec un motif de disques de 15 µm de

diamètre. Sur chaque disque, la quantité totale d'ADN était de 6 pg, ce qui correspond environ à la charge d'un fuseau mitotique chez *X. laevis* [4]. Les fuseaux produits avaient une longueur moyenne de $31,76 \pm 4,03$ µm ($n = 300$), ce qui correspond bien à la longueur des fuseaux chez l'animal [5]. Nous avons ensuite modifié la charge d'ADN par bille, pour changer la quantité de chromatine à géométrie constante. En multipliant ainsi par cinq la quantité d'ADN, les fuseaux ont atteint une longueur de $35,30 \pm 4,01$ µm, soit une

augmentation de 10 %. La quantité de chromatine influence donc la longueur du fuseau, mais c'est un effet mineur comparé à ce que nous avons observé ensuite en changeant la géométrie de la chromatine.

Pour changer la géométrie de la chromatine, nous avons d'abord fait varier le diamètre des disques. Les fuseaux bipolaires se forment de manière fiable entre 14 et 18 µm, et leur longueur augmente de manière linéaire en fonction du diamètre du disque de chromatine. Lorsque le diamètre est inférieur

à 8 µm, la nucléation de microtubules est insuffisante et il n'y a pas formation de fuseau. Sur des disques de plus de 20 µm, les structures sont multipolaires (Figure 2A). Il est aussi possible de changer le motif adhésif sur lequel les billes de chromatine sont immobilisées. Les fuseaux se forment aussi si la chromatine est rectangulaire (Figure 2B), mais il y a des limites à ne pas dépasser. Si la barre est trop longue, une multitude de pôles se forment, tous les $23,11 \pm 6,33$ µm en moyenne, et les fuseaux, croisés et imbriqués, sont inopérants. Si la barre de chromatine dépasse une largeur de 13 µm, les microtubules se retrouvent tous du même côté ! En variant la géométrie de la chromatine, nous avons ainsi révélé la capacité de la chromatine à façonner le fuseau mais également son adaptabilité limitée face à des distributions anormales de chromatine. Lorsque la bipolarité du fuseau ne peut s'établir durablement, des structures asymétriques ou multipolaires sont produites. Par exemple, lorsque la chromatine est trop large, le chevauchement, qui est normalement organisé par Eg5, ne se fait pas et la structure ne devient pas symétrique.

Le fuseau sans pôles des plantes ou comment ségrégner une charge importante d'ADN

Ces résultats permettent d'estimer la charge maximale de chromatine qui peut être ségrégée par un fuseau mitotique. En effet, ils montrent que, quelle que soit sa forme (cercle, rectangle), les dimensions qui caractérisent cette forme (rayon, longueur et largeur) doivent être en dessous d'un certain seuil. Au-delà de ces seuils, les structures produites n'ont pas la symétrie miroir nécessaire

pour répartir équitablement les chromosomes. De manière remarquable, il est possible d'imiter un fuseau mitotique végétal, en ajoutant une protéine appelée p50 à l'extrait de xénopé, ce qui empêche la dynéine d'organiser les pôles du fuseau (Figure 2C). Dans ces conditions, la longueur d'une barre de chromatine n'est plus un facteur limitant ! Même sur des barres de chromatine de plus de 100 µm, les microtubules s'organisent de manière parfaitement symétrique. Même si le seuil sur la largeur existe toujours, cela montre que, toutes choses égales par ailleurs, un fuseau sans pôle a une capacité supérieure qu'un fuseau avec pôles. Cela peut être avantageux, et effectivement, cette stratégie a prévalu pour les plantes à graines au cours de l'évolution. Ces plantes ont perdu à la fois centrosomes [6] et dynéine [7], qui sont nécessaires aux deux mécanismes connus de formation des pôles. Leurs fuseaux sans pôle peuvent accommoder des génomes énormes. Certaines plantes contiennent jusqu'à 260 pg d'ADN par noyau, soit une charge à ségrégier 40 fois plus importante que celle d'une cellule de xénopé ou d'Homme.

Et maintenant le fuseau en équation...

En conclusion, à géométrie égale, la variation de la masse de chromatine influence peu la longueur du fuseau. Par contre, la modification de la géométrie a un effet linéaire sur la longueur des fuseaux, quand elle ne détruit pas purement et simplement la symétrie du fuseau. Pour finir, la méthode développée présente deux autres avancées techniques majeures qui sont d'une part la possibilité de filmer la dynamique de formation des fuseaux mitotiques

in vitro, et d'autre part l'obtention d'un très grand nombre de structures à chaque expérience. Ce seront des avantages décisifs dans la phase de recherche qui s'ouvre maintenant, dont le but est de décrire mathématiquement l'assemblage du fuseau mitotique à l'aide d'un modèle quantitatif. ♦

Formation of the mitotic spindle depends on chromatin geometry and mass

REMERCIEMENTS

Nous remercions Stéphanie Blandin, Ludovic Brun et Laure Plantard pour leur relecture du document. Le laboratoire de F. Nedelec à l'EMBL est financé par BioMS (www.bioms.de), par la fondation Volkswagen et par le programme Human Frontier Science, contrat RGY84.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. Heald R, Tournebize R, Blank T, et al. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts. *Nature* 1996 ; 382 : 420-5.
2. Athale CA, Dinarina A, Mora-Coral M, et al. Regulation of microtubule dynamics by reaction cascades around chromosomes. *Science* 2008 ; 322 : 1243-7.
3. Dinarina A, Pugieux C, Mora Corral M, et al. Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell* 2009 ; 138 : 502-13.
4. Thiébaud CH, Fischberg M. DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma* 1977 ; 59 : 253-7.
5. Gatlin JC, Matov A, Groen AC, et al. Spindle fusion requires Dynein-mediated sliding of oppositely oriented microtubules. *Curr Biol* 2009 ; 19 : 287-96.
6. Bornens M, Azimzadeh J. Origin and evolution of the centrosome. *Adv Exp Med Biol* 2007 ; 607 : 119-29.
7. Wickstead B, Gull K. Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. *Traffic* 2007 ; 8 : 1708-21.
8. Castro A, Vigneron S, Lorca T, Labbé JC. Mitosis under control. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 309-17.
9. Terret ME, Wassmann K. Meiotic weakness: the first division. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 197-203.