MEDECINE/SCIENCES 2008 ; 24 : 897-927

NOUVELLE

Le récepteur de la ryanodine de type I

Un canal sous surveillance redox...

Joël Lunardi, Julien Fauré, Isabelle Marty, Nicole Monnier

Inserm U836, Institut des Neurosciences,
Équipe Muscle et Pathologies,
BP 170, 38042 Grenoble Cedex, France.
jlunardi@chu-grenoble.fr

> La contraction du muscle squelettique est causée par une brusque augmentation du Ca^{2+} myoplasmique résultant de la vidange du réticulum sarcoplasmique (RS). Elle est déclenchée par une dépolarisation membranaire causée par l'excitation nerveuse de la fibre musculaire. La dépolarisation se propage jusqu'à des invaginations de la membrane plasmique, les tubules transverses (TT) *(Figure 1)*. À ce niveau, la première étape du couplage excitation-contraction (CEC) est l'activation du récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique de la membrane des TT sensible au voltage. La sortie du Ca^{2+} du RS, nécessaire à l'étape suivante d'activation des unités contractiles, se fait grâce à un canal calcique exprimé au niveau de la membrane du RS, le récepteur de la ryanodine de type I (RYR1). Elle est déclenchée par une interaction mécanique directe entre le DHPR activé et RYR1.

RYR1 : un complexe macromoléculaire

Le relâchement de Ca^{2+} du RS est réalisé par un homo-tétramère de sous-unités RYR1 (≈ 565 kDa par sous-unité) auquel sont associées de nombreuses protéines régulatrices (FKBP12, calmoduline, triadine, junctine, calséquestrine...). Chaque sous-unité RYR1 est formée d'une partie transmembranaire carboxy-terminale contenant le pore, et d'une large partie amino-terminale cytoplasmique impliquée dans la régulation de l'activité du canal. L'éventail des effecteurs endogènes de RYR1 s'étend d'ions et de petites molécules (Ca^{2+}, Mg^{2+}, adénine-nucléotides) à des polypeptides (calmoduline, FKBP12...) [1].

Régulation redox de RYR1

RYR1 est une cible pour les espèces oxygénées réactives (ROS, *reactive oxygen species*) et les espèces azotées réactives (RNS, *reactive nitrogen species*) produites lors de l'activité physique physiologique. RYR1 contient un total de 100 résidus cystéinyls, la moitié se trouvant à l'état réduit dans le muscle au repos et 6-10 d'entre eux étant plus particulièrement réactifs. L'activation du canal RYR1 serait modulée par des modifications redox de ces thiols par oxydation, S-nitrosylation ou alkylation. Chaque sous-unité compte entre 38 et 48 thiols à l'état libre, sensibles à l'oxydation. L'état d'activation de RYR1 répond de manière biphasique à l'administration de doses croissantes d'oxydants, le maximum d'activation se situant pour un état impliquant 23 SH/RYR1 [2]. L'oxyde nitrique NO est également considéré comme un modulateur physiologique de l'état redox de RYR1 par S-nitrosylation [3]. Par ailleurs,

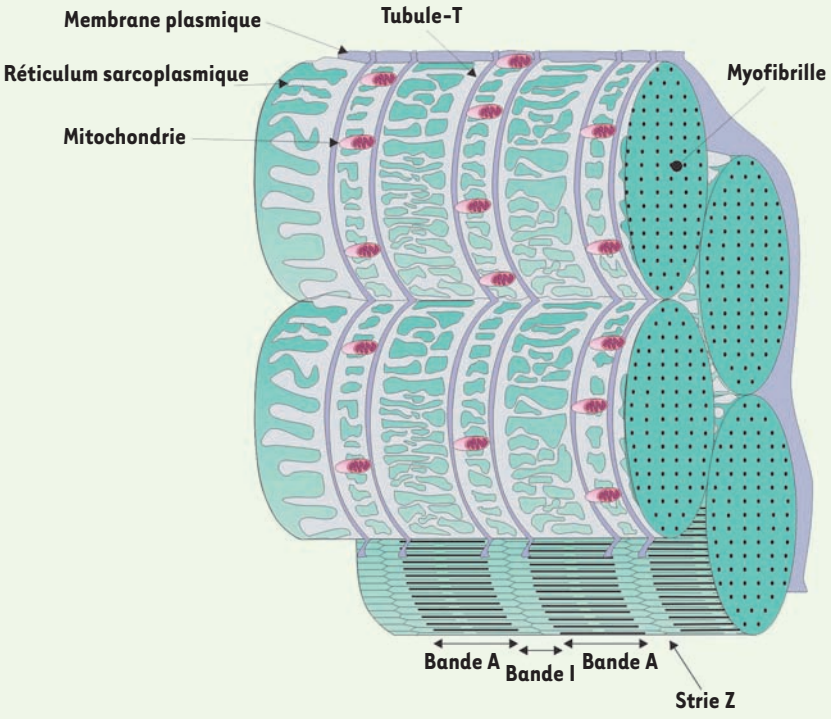


Figure 1. ***Structure d'une fibre musculaire.***

Nouvelles.indd 897 29/10/2008 14:33:55

l'état redox et l'activité de RYR1 seraient aussi contrôlés par la pression partielle en O_2 [4].

RYR1 et physiopathologie

Un catalogue de mutations aux conséquences fonctionnelles variées

Plus de 200 mutations du gène *RYR1* responsables de pathologies ont été identifiées [5]. L'hyperthermie maligne *per* anesthésique (HM) est une maladie pharmacogénétique dominante déclenchée par une exposition aux anesthésiques halogénés. La crise d'HM se caractérise principalement par une contracture musculaire généralisée, un emballement métabolique avec hypercapnie et une élévation très importante de la température centrale. En l'absence de traitement par un inhibiteur de RYR1, le dantrolène, l'issue de la crise est le plus souvent fatale. Les mutations HM sont principalement trouvées dans 2 domaines, MH1 et MH2, localisés dans les parties amino-terminale et centrale de RYR1.

Un second groupe de maladies associées à des mutations de RYR1 sont les myopathies congénitales à *cores*. Il s'agit d'une famille de myopathies de sévérité variable, à transmission dominante ou récessive et caractérisées par la présence d'altérations morphologiques des fibres musculaires, les *cores*. Les *cores* sont des régions de désorganisation sarcomérique au sein desquelles on ne trouve plus de mitochondries. Le nombre de cores, leur taille et leur localisation dans la fibre musculaire peuvent varier et cette hétérogénéité a suscité l'établissement d'une nosologie histologique de ces myopathies: *central core disease* (CCD), *multiminicore disease* (MmD)... Les mutations des formes dominantes de ces myopathies sont surtout concentrées dans la partie carboxy-terminale du canal, celles des formes récessives sont retrouvées tout au long du gène.

Les études fonctionnelles des différentes mutations du gène *RYR1* ont montré que certaines mutations conduisent à un canal RYR1 « fuyant » entraînant une élévation du Ca^{2+} cytoplasmique au repos, et d'autres aboutissent à une perte du couplage fonctionnel entre le DHPR et RYR1 ; un petit nombre enfin affecte la quantité de molécules RYR1 présentes dans le RS.

Divergence phénotypique souris/homme pour la mutation p.Y522S de RYR1

L'équipe de Susan Hamilton a récemment créé un modèle murin *knock-in* pour la mutation p.Y522S de RYR1 [6]. Cette mutation avait été initialement identifiée dans une famille française atteinte d'HM chez laquelle les sujets porteurs de la mutation, susceptibles à l'HM, ne présentaient aucun symptôme hormis la présence de quelques « *cores* » dans les muscles de 2 des 3 patients HM [7]. La souris hétérozygote p.Y522S présente une sensibilité accrue à la caféine et à l'halothane avec un relâchement excessif du Ca^{2+} du RS, en accord avec le phénotype « hyperthermie maligne » observé chez l'homme. À la différence de la pathologie humaine, aucun *core* n'a cependant été caractérisé et des altérations des mitochondries ont été observées dans les muscles de ces souris. Une autre différence importante observée chez l'animal est le développement de contractures généralisées et l'abaissement de la force musculaire en réponse à une augmentation de la température ambiante. De manière surprenante, les souris homozygotes pour la mutation sont caractérisées par une létalité embryonnaire ou néo-natale et une dysmorphie musculaire importante. Ceci n'a jamais été observé chez les patients homozygotes pour des mutations du gène *RYR1* responsables de l'HM [8]. Les auteurs suggèrent que

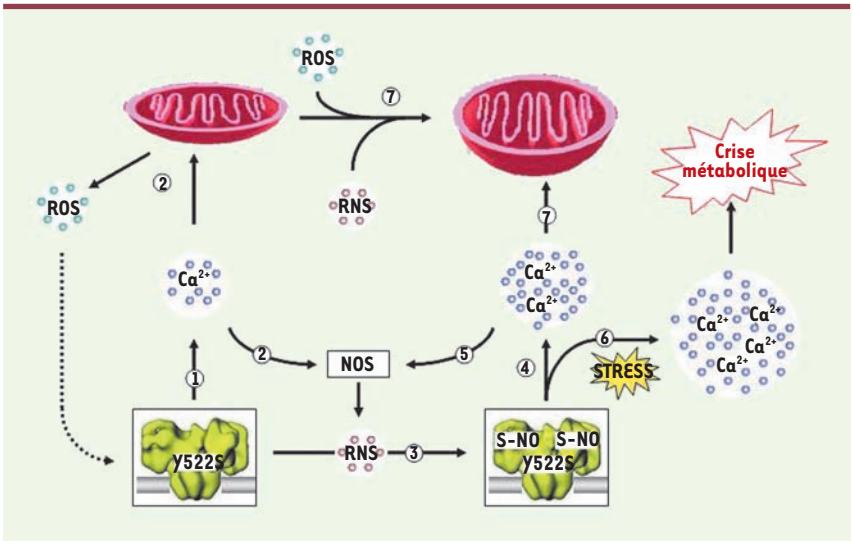


Figure 2. ***Modèle de dysrégulation de l'homéostasie calcique par modification redox du récepteur de la ryanodine RYR1 porteur d'une mutation de type « canal fuyant ». 1.*** Le canal mutant s'ouvre plus facilement et entraîne une augmentation locale de la concentration en Ca^{2+} dans la fibre au repos. ***2.*** Le niveau plus élevé de Ca^{2+} augmente la production de ROS/RNS *via* une action au niveau des mitochondries et des NO synthases (NOS). ***3.*** Les ROS/RNS induisent la S-nitrosylation et S-glutathionylation de RYR1. ***4.*** La S-nitrosylation augmente la sensibilité à la température de RYR1 et diminue sa sensibilité à l'inhibition par le Ca^{2+}, ce qui augmente la sortie de Ca^{2}. ***5.*** La sortie de Ca^{2+} augmente la production de ROS/RNS. ***6.*** La sortie de Ca^{2+} du canal mutant est fortement augmentée en réponse à un stress (thermique, oxydatif) et conduit à un emballement métabolique avec contraction des sarcomères et activation de systèmes protéolytiques. ***7.*** Les niveaux élevés de ROS, RNS et Ca^{2+} peuvent être la cause de dommages mitochondriaux chroniques.

Nouvelles.indd 898 29/10/2008 14:33:57

chez cette souris, la présence à l'état hétérozygote de la mutation p.Y522S serait associée à une fuite de Ca^{2+} du RS responsable d'une activation de la nNOS (*nitric oxide synthase*) [9]. Les RNS produits entraîneraient une S-nitrosylation de la Cys 3635 de RYR1 se traduisant par une augmentation de l'activation du canal muté à des températures supra-physiologiques. La fuite de Ca^{2+} du RS causée par la mutation p.Y522S serait par ailleurs responsable d'un stress oxydatif chronique générateur d'altérations mitochondriales, elles-mêmes susceptibles d'amplifier le stress oxydatif et d'enclencher un cycle délétère stress-dommages *(Figure 2)*. Il est cependant à noter qu'aucune altération significative des mitochondries n'a été observée dans les muscles des patients porteurs de la mutation p.Y522S, ni décrite dans les muscles de nombreux autres patients porteurs de mutations de type HM.

Conclusions et perspectives

Des travaux récents réalisés chez la souris et chez l'homme montrent qu'en réponse à un exercice physique intense, RYR1 serait le siège d'un important remodelage comportant d'une part une phosphorylation de la Ser 2843 dépendante de la PKA (*protein kinase A*) et une S-nitrosylation des Cys 3635 et 2327, et d'autre part une déplétion en FKBP12 [10]. La fuite importante du Ca^{2+} du RS au travers de ces RYR1 « remodelés » pourrait être la cause de dommages musculaires *via* une activation de la calpaïne par le Ca^{2+} et être l'un des composants de la limitation à l'exercice des muscles squelettiques.

Ces différentes données montrent que les modifications de l'état redox de RYR1 jouent un rôle important dans la modulation de son activité canal. Les différents événements impliqués dans le remodelage de RYR1 normal ou muté pourraient constituer des cibles thérapeutiques comme le suggère l'action du JTV519, une 1,4-benzothiazépine qui provoque la fixation de FKBP12 sur RYR1 et qui améliorerait la fonction musculaire squelettique dans un modèle d'infarctus post-myocardique chez le rongeur [10]. ◊

Ryanodine receptor: redox state matters

RÉFÉRENCES

1. Lacampagne A, Fauconnier J, Richard S. Récepteur de la ryanodine et dysfoctionnement myocardique. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 24 : 399-405.
2. Sun J, Xu L, Eu JP, *et al.* Classes of thiols that influence the activity of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 15625-30.
3. Aghdasi, B, Reid MB, Hamilton SL. Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca^{2+} release channel from oxidation induced activation. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 25462-7.
4. Eu JP, Sun J, Xu L, *et al.* The skeletal muscle calcium release channel: coupled O_2 sensor and NO signaling functions. *Cell* 2000 ; 102 : 499-509.
5. Monnier N, Kozak-Ribbens G, Krivosic-Horber R, *et al.* Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat* 2005 ; 26 : 413-25.
6. Chelu MG, Goonasekera SA, Durham WJ, *et al.* Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse. *FASEB J* 2006 ; 20 : 329-30.
7. Quane KA, Keating KE Healy JMS, *et al.* Mutation screening of the RYR1 gene in malignant hyperthermia: detection of a novel Tyr to Ser mutation in a pedigree with associated cores. *Genomics* 1994 ; 23 : 236-9.
8. Monnier N, Krivosic-Horber R, Payen JF, *et al.* Presence of two different genetic traits in malignant hyperthermia families. *Anesthesiology* 2002 ; 97 : 1067-74.
9. DurhamWJ, Aracena-Parks P, Long C, *et al.* RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell* 2008 ; 133 : 53-65.
10. Bellinger AE, Reiken S, Dura M, *et al.* Remodeling of ryanodine receptor complex causes leaky channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 2198-2202.

NOUVELLE

Inflammation intestinale et stress du réticulum endoplasmique

Un lien génétique

Eric Chevet

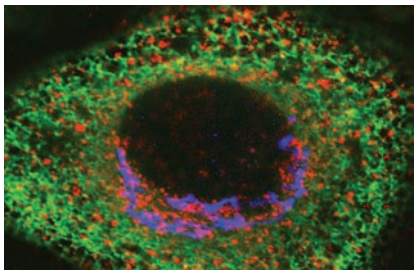
Avenir Inserm U889, Université Bordeaux 2, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France
eric.chevet@u-bordeaux2.fr

› Les maladies inflammatoires de l'intestin ont souvent été attribuées à une réponse immunitaire de la muqueuse intestinale à la flore microbienne. Cependant les mécanismes exacts impliqués dans ce processus inflammatoire restent mal connus. Dans deux revues récentes, les équipes de Randal Kaufman et Laurie Glimcher ont décrit le rôle potentiel des voies de signalisation du stress émanant du réticulum endoplasmique (RE) dans l'inflammation et la réponse immunitaire [1, 2]. Cette réponse cellulaire intégrée - appelée *Unfolded Protein Response* (UPR) - est activée en réponse à une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Elle facilite le repliement, l'export et la dégradation des protéines dans des conditions de stress [3]. Dans les cellules de mammifères, la réponse UPR est sous le contrôle de trois protéines transmembranaires du RE, dont l'*inositol requiring enzyme-1 alpha and beta* (IRE1$\alpha\beta$). IRE1 est la protéine initiatrice de la voie de signalisation de l'UPR la plus conservée au

Nouvelles.indd 899 29/10/2008 14:33:58

cours de l'évolution. Elle possède dans son domaine cytosolique une activité kinase et une activité endoribonucléase dont l'activation lors du stress du RE contribue à l'épissage non conventionnel d'un intron de 26 nucléotides dans l'ARNm codant pour la protéine *X-box binding protein-1* (XBP1). Cela conduit à un changement du cadre de lecture et à la traduction d'une nouvelle protéine, dont les propriétés de facteur de transcription conduisent à l'induction d'un groupe de gènes cibles de l'UPR.

Jusqu'à aujourd'hui, l'UPR a été impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques et physiopathologiques incluant les maladies neurodégénératives, le diabète ou encore les cancers [4, 5]. Dans un article récent, Arthur Kazer *et al.,* démontrent pour la première fois le rôle clé joué par le stress du RE dans les maladies inflammatoires de l'intestin [6]. En effet, des souris déficientes pour l'expression de XBP-1 dans les cellules épithéliales intestinales (CEI, dont il existe 4 types : cellules neuroendocrines, cellules à mucus, entérocytes, et cellules de Paneth) développent spontanément une entérite due à la baisse de la capacité des CEI à générer une activité antimicrobienne (cytokines) et à répondre de manière appropriée aux signaux inflammatoires locaux (protéines anti-inflammatoires). Il est intéressant de recouper ces informations avec les données obtenues chez des souris déficientes pour l'expression de IRE1β, normalement restreinte au tractus gastro-intestinal, qui développent une hypersensibilité à la colite induite par le sulfate de dextran [7]. Cette découverte a été complétée par l'identification de polymorphismes touchant un nucléotide unique (SNP) rares dans le gène codant pour XBP1 et dont la présence confère un risque pour la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU) dans une



cohorte de patients comprenant plus de 5 000 contrôles et 4 000 malades. Par conséquent, ce travail établit pour la première fois la contribution génétique du stress du RE aux maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme [6]. Ces résultats semblent donc indiquer une responsabilité des voies de stress du RE (et en particulier de l'axe IRE1/XBP1) dans les mécanismes inflammatoires dans les CEI. Qui plus est, des mutations somatiques présentes dans le gène codant pour IRE1α ont été associées à des processus de carcinogenèse [8]. Dans de telles conditions, pourquoi ne pas rechercher systématiquement d'éventuelles mutations dans les gènes codant pour les intermédiaires de signalisation de la voie IRE1 dans des maladies présentant des signes d'inflammation chronique associée à des cellules ayant une fonction sécrétrice essentielle ? ou bien chercher des modulateurs pharmacologiques de cette voie de signalisation dont l'intérêt thérapeutique pourrait s'avérer réel ? ◊

Intestinal inflammation and endoplasmic reticulum stress: a genetic link

RÉFÉRENCES

1. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 663-74.
2. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008 ; 454 : 455-62.
3. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 519-29.
4. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006 ; 86 : 1133-49.
5. Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 10631-4.
6. Kaser A, Lee AH, Franke A, *et al.* XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008 ; 134 : 743-56.
7. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, *et al.* Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 585-93.
8. Greenman C, Stephens P, Smith R, *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007 ; 446 : 153-8.

Nouvelles.indd 900 29/10/2008 14:33:58

Comment les granzymes tuent leurs cibles

Jérôme Thiery, Denis Martinvalet

Immune Disease Institute, Harvard Medical School, 200 Longwood Avenue, Boston MA 02115, États-Unis.
martinvalet@idi.harvard.edu

Perforine, granulysine et granzymes, effecteurs de la cytotoxicité

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les cellules *natural killer* (NK) sont essentiels à la réponse immunitaire anti-tumorale et à la défense contre les pathogènes intracellulaires. Des études chez la souris et chez l'homme ont montré que l'élimination des cellules cancéreuses et des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires tels que les mycobactéries et les virus implique l'exocytose des granules cytotoxiques de ces lymphocytes [12]. En revanche, la terminaison de la réponse immunitaire nécessite l'activation de la voie Fas. Ces granules cytotoxiques, des lysosomes de sécrétion spécialisés, contiennent la perforine (PFN) et la granulysine - deux protéines capables de former des pores dans la membrane plasmique et d'altérer la paroi des bactéries - ainsi qu'une famille de protéases à sérine appelées granzymes. Parmi les cinq granzymes décrites chez l'homme et les dix identifiées chez la souris, les granzymes A (GzmA) et B (GzmB) sont les plus abondantes. Une fois les cellules cibles reconnues, les CTL ou les cellules NK sécrètent le contenu de leurs granules dans la synapse immunologique. PFN permet l'entrée des Gzm dans la cellule cible, déclenchant ainsi des cascades biochimiques multiples qui, bien que distinctes, conduisent toutes à la mort cellulaire [1, 2].

Comment les Granzymes tuent leurs cibles : une nouvelle voie apoptotique pour GzmA

Au cours des dernières décennies, d'intenses recherches ont permis de mieux comprendre les mécanismes apoptotiques initiés par GzmB. Comme les caspases, GzmB clive ses substrats au niveau de résidus acide aspartiques, et initie ainsi la perforation de la membrane externe de la mitochondrie, libérant des protéines pro-apoptotiques (cytochrome c, HtrA2/Omi, endo G, Smac/Diablo et AIF, *apoptosis-inducing factor*) depuis l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytoplasme. Suivant les cas, cette voie est dépendante ou indépendante des caspases [1, 2].

L'essentiel des travaux portant sur la voie de la mort cellulaire induite par une autre granzyme, GzmA, a été effectué par l'équipe du Pr. Judy Lieberman. Au sein de cette équipe, nous avons montré que la mort cellulaire induite par GzmA présente toutes les caractéristiques morphologiques de l'apoptose, c'est-à-dire la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, l'externalisation des phosphatidyl-sérines à la surface cellulaire, la perte du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) mitochondriale et la production de ROS (*reactive oxygen species*) [13]. Cependant, cette voie est complètement indépendante des caspases et des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl_2. Dans cette nouvelle voie apoptotique, la fragmentation de l'ADN se fait par cassures simple brins. Par ailleurs, nous avons établi que le complexe SET est une cible-clé de GzmA [3]. Ce complexe, qui est associé au réticulum endoplasmique, comprend les nucléases activées par GzmA, NM23-H1 et TREX 1, la protéine phosphatase PP2A et son inhibiteur pp23, et trois substrats directs de GzmA, les protéines Set, Ape1 et HMGB2 impliquées respectivement dans l'assemblage des nucléosomes, la réparation des altérations de l'ADN induites par le stress oxydatif et le remodelage de la chromatine. Lors de l'apoptose induite par GzmA, la translocation rapide du complexe SET vers le noyau conduit à la dégradation de la protéine Set par GzmA, libérant ainsi l'endonucléase NM23-H1 qui, de concert avec l'exonucléase TREX 1, induit la fragmentation de l'ADN [4, 5]. En même temps, GzmA clive et inactive Ku70, HMGB2, Ape 1, empêchant ainsi la réparation de l'ADN [6-8].

Tous les chemins pro-apoptotiques de GzmA et GzmB convergent vers la mitochondrie

La mitochondrie tient une place centrale dans l'apoptose induite par GzmA. Dans les minutes suivant le traitement de cellules avec GzmA et PFN, nous avons observé une forte production de ROS accompagnée d'une perte du $\Delta\Psi_m$ mitochondrial. GzmA agit directement sur la mitochondrie puisque la production de ROS et la perte du $\Delta\Psi_m$ sont obtenues par simple addition de GzmA à des mitochondries purifiées, en l'absence de facteurs cytosoliques. Nous avons aussi démontré que les ROS produites par la mitochondrie en réponse à GzmA, et en particulier l'anion superoxide ($O_2^{\cdot -}$), sont non seulement indispensables pour la translocation nucléaire du complexe SET mais aussi pour la mort cellulaire induite par GzmA et par les CTL. De plus, la production de ROS et la perte du $\Delta\Psi_m$ ne sont pas accompagnées de la libération de protéines pro-apoptotiques de

Nouvelles.indd 901 29/10/2008 14:33:59

l'espace inter-membranaire de la mitochondrie vers le cytoplasme. Contrairement à ce qui se passe lors de l'apoptose induite par GzmB et Fas-L, la membrane mitochondriale externe demeure intacte lors de l'apoptose induite par GzmA. Nos travaux démontrent aussi pour la première fois que la production des ROS est indépendante de l'altération de la membrane mitochondriale externe et que ces ROS sont nécessaires à la mort cellulaire induite par GzmA [9] *(Figure 1)*. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires d'induction de ces ROS par GzmA, nous avons utilisé une approche protéomique à partir de mitochondries purifiées. Nous avons ainsi identifié NDUFS3 (la sous unité 30 kDa du complexe I NADH : Ubiquinone oxydoréductase de la chaîne respiratoire) comme étant une cible de GzmA. GzmA hydrolyse NDUFS3 et inhibe l'activité enzymatique du complexe I, conduisant ainsi à la production de ROS et à la mort cellulaire. En effet, des cellules surexprimant une forme non-hydrolysable de NDUFS3 ne produisent plus de ROS et deviennent résistantes à l'apoptose induite soit par GzmA soit par l'attaque de CTL n'exprimant que GzmA. Par ailleurs, l'équipe du Dr Douglas Green a démontré que la caspase 3 clive NDUFS1, la sous unité de 75 kDa de ce même complexe I de la chaîne respiratoire [10]. Ces résultats montrent donc que des voies apoptotiques différentes convergent vers le complexe I, soulignant ainsi l'importance de son inactivation et de la production de ROS au cours de la mort cellulaire.

Comment GzmA pénètre t-elle dans la mitochondrie ?

Tout n'est pas résolu, en particulier, comment GzmA peut-elle atteindre son substrat NDUFS3 de localisation mitochondriale ? En effet, GzmA ne possède pas de séquence d'adressage mitochondrial et n'altère pas la membrane mitochondriale externe. Un début de réponse nous vient de l'observation que tous les effets de GzmA sur la mitochondrie sont dépendants du $\Delta\Psi_m$ mitochondrial. En effet, la valinomycine, un protonophore qui annule le $\Delta\Psi_m$ mitochondrial, inhibe l'hydrolyse de NDUFS3 et la production des ROS induite par GzmA. Nous avons aussi démontré que GzmA interagit de façon spécifique avec les protéines Hsp70 et Hsp90. En plus de leur fonction de chaperon, ces protéines sont des cofacteurs de la machinerie d'import protéique de la mitochondrie. Cette machinerie utilise le $\Delta\Psi_m$ comme force motrice afin de faire entrer les pré-protéines dans l'organite. Il est donc probable que GzmA utilise cette voie d'import protéique afin de pénétrer dans la matrice mitochondriale.

Perspectives

Parce que la mort cellulaire activée par GzmA est indépendante des caspases et de Bcl2, elle semble être un atout du système immunitaire pour lutter contre les cellules cancéreuses surexprimant Bcl2 et contre des cellules infectées par des virus exprimant des inhibiteurs de caspases. Par ailleurs, une étude récente a démontré que le complexe SET est impliqué dans l'altération de l'ADN et l'apoptose des neurones lors d'accidents vasculaires cérébraux. Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'en réponse à une chute du pH intracellulaire, l'endopeptidase lysosomale à arginine (AEP) clive Set et libère NM23-H1 afin d'induire la fragmentation de l'ADN [11]. Les souris déficientes en AEP sont résistantes à ce type de mort neuronale. Il en découle que l'étude de la mort cellulaire induite par GzmA aidera non seulement à une meilleure compréhension de l'apoptose induite par les cellules immunitaires mais aussi celle induite par le stress des neurones. De façon plus générale, ces travaux devraient faciliter l'élaboration de nouvelles approches pour le traitement de tumeurs, de maladies auto-immunes ou neuro-dégénératives. ◊

A novel caspase-independent apoptotic pathway triggered by Granzyme A

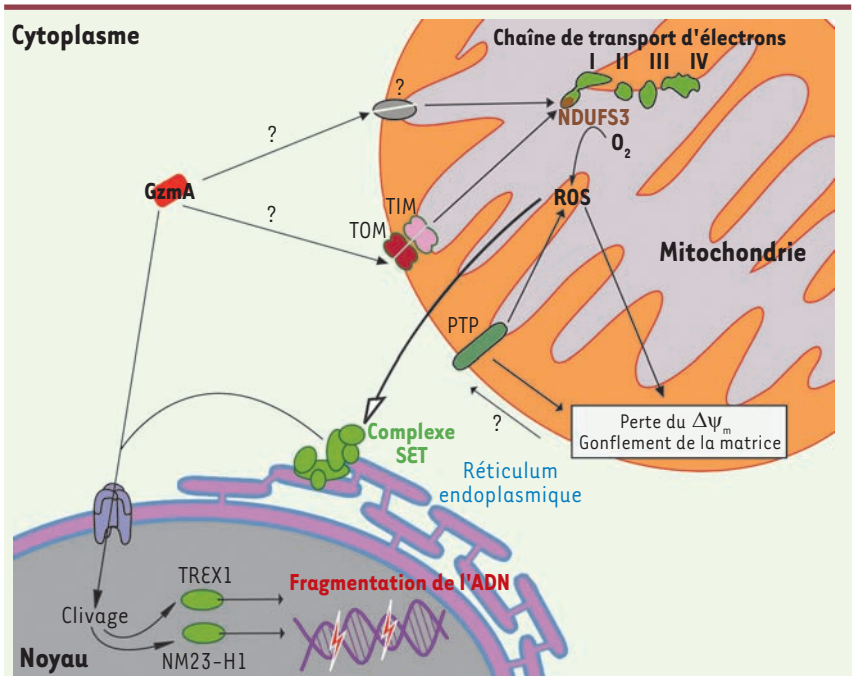


Figure 1. ***Mécanismes d'induction de la mort cellulaire par Granzyme A.*** Dans le cytosol de la cellule cible GzmA est transporté dans la matrice mitochondriale probablement par le complexe TIM/TOM. GzmA clive NDUFS3 au sein du complexe I afin de produire des ROS. Ces ROS permettent la translocation nucléaire du complexe SET où GzmA hydrolyse Set permettant aux nucléases NM23-H1 et TREX de fragmenter l'ADN afin d'induire la mort cellulaire.

Nouvelles.indd 902 29/10/2008 14:33:59

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Edouard Vannier et le Dr Emmanuel Derudder pour la relecture de ce texte.

RÉFÉRENCES

1. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008 ; 26 : 389-420.
2. Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 2003 ; 15 : 553-9.
3. Beresford PJ, Zhang D, Oh DY, *et al.* Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 43285-93.
4. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, *et al.* Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 2003 ; 112 : 659-72.
5. Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, *et al.* The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 2006 ; 23 : 133-42.
6. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, *et al.* HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 2810-20.
7. Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, *et al.* Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 145-53.
8. Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, *et al.* Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 431-7.
9. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005 ; 22 : 355-70.
10. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, *et al.* Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* 2008 ; 133 : 681-92.
11. Liu Z, Jang SW, Liu X, *et al.* Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase. *Mol Cell* 2008 ; 29 : 665-78.
12. Ménasché G, Ménager M, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G. Défaut d'exocytose des granules lytiques : plusieurs causes, un même effet. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 733-8.
13. Barouki R. Stress oxydant et vieillissement. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 266-72.

NOUVELLE

XenoMouse : un tour de force pour l'obtention d'anticorps humains chez la souris

Dominique Bellet, Alain Pecking, Virginie Dangles-Marie

UMR 8149 CNRS, IFR 71,
Université Paris Descartes, Paris 5,
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris,
4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris,
France et Laboratoire d'oncobiologie,
Centre René Huguenin,
35, rue Dailly, 92100 Saint-Cloud, France.
dominique.bellet@univ-paris5.fr

L'avènement des anticorps humanisés

Lorsque, en juin et en septembre 2006, les autorités fédérales américaines (*Food and Drug Administration, FDA*) ont donné leur accord pour la mise sur le marché et l'utilisation en clinique du ranibizumab (Lucentis) et du panitumumab (Vectibix), ces annonces n'ont suscité qu'un intérêt modeste dans les journaux scientifiques ou dans la grande presse. L'utilisation en clinique de ces médicaments représente pourtant des premières mondiales : ils résultent en effet de l'humanisation d'anticorps par deux approches différentes. Le ranibizumab est une véritable innovation[1] : c'est un fragment Fab d'un anticorps monoclonal humanisé d'isotype IgG1κ, où seules sont conservées les régions CDR (*complementarity determining region*) murines alors que les autres régions sont remplacées par des régions humaines [1]. Dirigé contre le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), il est utilisé pour le traitement intraoculaire de la dégénérescence maculaire [2, 11]. Le panitumumab (Vectibix ; Amgen), quant à lui, est le premier anticorps entièrement humain utilisé en clinique et produit par une souris transgénique, la fameuse « *XenoMouse* » [3]. C'est une immunoglobuline d'isotype IgG2κ qui se lie avec une forte affinité à l'EGFR (*epithelial growth factor receptor*), inhibant l'activation des cellules tumorales dépendante de l'EGF, d'où son indication dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR [4].

[1] L'innovation se distingue de l'invention en cela que la seconde peut être une idée brillante, mais que la première n'existe que si elle s'incarne. Dans le monde économique, on ne parle d'innovation que si celle-ci va jusqu'au marché ». D'après «Ce que je crois» d'Herve Sérieyx

Production d'anticorps humanisés chez la souris : la « xénomouse »

La « *XenoMouse* » est une souris transgénique qui exprime la grande majorité des gènes codant les immunoglobulines (Ig) humaines. Chez ces souris, la machinerie servant à la production d'Ig de souris est inactivée et « humanisée » avec la presque totalité des locus correspondant aux gènes codant les Ig humaines afin de permettre chez la souris la production d'une large diversité d'anticorps humains de forte affinité. Deux manipulations génétiques majeures ont été nécessaires à la construction de ces souris : (1) l'inactivation de la machinerie cellulaire servant à la production des Ig murines ; (2) l'introduction des locus correspondant aux chaînes lourdes et légères des Ig humaines *(Figure 1)*, ce qui était loin d'être aisé puisque ces locus ont des tailles de plusieurs mégabases (Mb). Dans le cas de la « *XenoMouse* », ces manipulations ont été réalisées dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES pour *embryonic stem*). Les gènes codant les chaînes lourdes et légères kappa (κ) ont été inactivés par délétion des séquences *cis* cruciales pour le réarrangement et

Nouvelles.indd 903 29/10/2008 14:34:00

l'expression des gènes d'Ig murines. La délétion de la région JH murine inhibe complètement la machinerie cellulaire permettant la recombinaison des chaînes lourdes et abolit la production d'Ig murines. La délétion de la région murine Cκ inactive le locus murin des Igκ murines. Les croisements successifs des souris homozygotes JH et Cκ conduisent à des souches doublement inactivées chez lesquelles la production d'anticorps et le développement des cellules B sont complètement arrêtés. Cependant, ces souris possèdent toujours les facteurs transactivateurs nécessaires au réarrangement et à l'expression des gènes des Ig, et ont les éléments nécessaires pour l'introduction des locus des Ig humaines non réarrangées. Le véritable « tour de force » a ensuite été de transférer chez la souris de larges portions des locus correspondant aux gènes des Ig humaines pour préserver la diversité génique et la régulation de l'expression et de la maturation des anticorps. Le clonage de ces locus a été facilité par l'utilisation des chromosomes artificiels de levure (*yeast artificial chromosome, YAC*) qui permet l'isolement et la manipulation génétique de grands fragments d'ADN de la taille d'une mégabase. Ainsi 80 % du répertoire correspondant aux régions VH a été cloné et joint aux régions constantes humaines γ1, γ2 ou γ4 pour obtenir trois YAC différents produisant trois isotypes correspondant respectivement aux IgG1, IgG2 ou IgG4 humaines. Des YAC contenant les locus correspondant aux chaînes légères kappa (κ) ont ensuite été construits. Les YAC sont alors introduits dans des cellules ES par fusion de ces cellules avec des sphéroplastes de levures contenant les YAC. Le croisement des souris issues de cette fusion et exprimant les chaînes lourdes et légères des Ig humaines en présence d'Ig murines avec les souris doublement inactivées a conduit à trois différentes « *XenoMouse* » qui produisent des IgG1κ, IgG2κ ou IgG4κ. Ultérieurement, le locus entier correspondant aux chaînes légères lambda (λ) a été introduit dans les « *XenoMouse* » permettant d'obtenir des souches produisant à la fois des anticorps humains IgGκ et IgGλ dans un rapport 60 : 40.

L'immunisation de ces « xenomouse » avec de multiples antigènes, suivie de la production d'hybridomes, a montré que ces souris étaient capables de recombinaison des gènes d'Ig avec une maturation de l'affinité des anticorps, permettant ainsi d'obtenir la production d'anticorps monoclonaux humains de forte affinité pour l'antigène. Les essais cliniques réalisés avec le panitumumab ont montré que ces anticorps sont faiblement immunogènes chez l'homme avec la présence d'anticorps humains anti-panitumumab chez 0,3 % à 4,1 % des patients selon la technique de détection utilisée. Toutefois, chez les patients où ces anticorps anti-panitumumab étaient détectables, le risque de réactions d'hypersensibilité est faible [3]. En fait, il aura fallu plus de vingt ans pour qu'une souris produise un anticorps humain utilisé en clinique. En 1985, Georges Yancopoulos avait été le premier à introduire des éléments d'Ig humaines dans des cellules B murines [5]. Six années ont ensuite été nécessaires pour dériver les souches de souris et développer l'anticorps, puis 6 autres années pour le développement clinique.

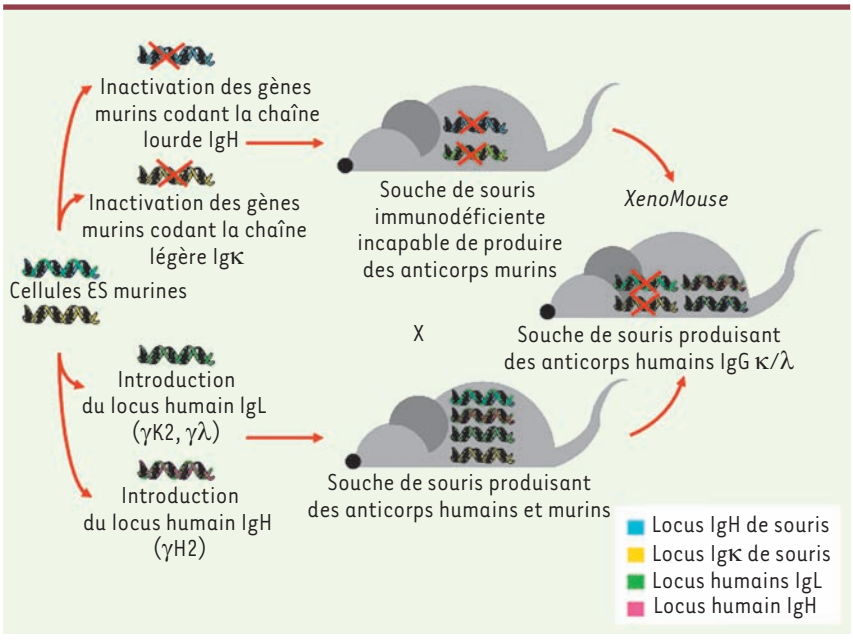


Figure 1. *Principe de la production d'anticorps humain par la « XenoMouse ».*

Futures innovations : *nanobodies* et *versabodies* ?

Les fragments d'anticorps humanisés et les anticorps humains produits par les « *XenoMouse* » ne représentent probablement pas les ultimes innovations issues de l'ingénierie des anticorps. Au moment où ces molécules arrivent en clinique, il y a une certaine compétition entre les anticorps et les petites molécules chimiques dirigées contre les mêmes cibles. C'est par exemple le cas pour deux anticorps, le cetuximab (Erbitux) et le panitumumab et deux petites molécules, le gefitinib et l'erlotinib, tous dirigés contre l'EGFR. Les anticorps ont une large surface de contact avec leur cible et une bonne reconnaissance de celle-ci mais une aire d'action (géographie) limitée à la surface membranaire. Un courant de recherche important existe cependant concernant l'expression intracellulaire de fragments d'anticorps pour cibler des protéines virales ou des protéines oncogéniques. À l'inverse, les petites molécules chimiques ont une géographie large puisque

Nouvelles.indd 904 29/10/2008 14:34:00

leurs cibles peuvent être intracellulaires mais leur surface de contact avec cette cible est plus petite. Il y a donc un intérêt grandissant pour des formes plus petites d'anticorps qui allieraient une large surface de contact avec la cible et une grande aire d'action allant de la surface cellulaire au domaine intracellulaire. De tels fragments existent déjà sous des formes mono- ou bispécifiques, *tetrabodies, triabodies, diabodies* ou fragments simples (scFv) *(Figure 2)*. Plusieurs de ces fragments d'anticorps sont en phase préclinique ou testés dans des essais cliniques (pour une revue, voir [7]).

D'autres formes de fragments, les domaines simples VHH ou *nanobodies*, et les *versabodies*, sont dérivées des structures proches des Ig trouvées chez des animaux tels que le chameau, le lama, les serpents ou les anémones. L'intérêt de ces formes peu immunogènes serait qu'elles peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule ou être utilisables par voie orale. Des techniques d'ingénierie d'anticorps visent à modifier la région Fc, par exemple pour changer les propriétés des sites de liaison des anticorps au complément ou au récepteur pour la région Fcγ [8]. Récemment, des constructions complexes telles que les *dual- variable domain immunoglobulin* (DVD-Ig) ont également été réalisées [9].

Pour fabriquer ces nouvelles formes d'anticorps, les « outils » de production que sont les « *XenoMouse* » ou les librairies de phages pourraient également évoluer ou être remplacés par d'autres « outils ». Les librairies de phages, qui ont été les premiers « outils » à donner naissance à un anticorps entièrement humain approuvé en clinique, sont progressivement optimisées [10]. Cependant, depuis la mise sur le marché de l'adalimumab (Humira) dirigé contre le TNFα et utilisé pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, aucun nouvel anticorps produit par les librairies de phages n'a reçu l'aval des autorités pour être utilisé en clinique. Les « *XenoMouse* » pourraient également être remplacées, car, si elle produisent des anticorps de forte affinité, elles sont, comme toutes souris chimériques, difficiles à élever. Alors, l'avenir est peut-être à la « *VelociImmune* ». C'est tout du moins ce que doivent penser les scientifiques d'AstraZeneca puisque cette compagnie qui a pourtant accès aux « *XenoMouse* » a accepté d'investir 120 millions de dollars pour avoir accès aux « *VelociImmune* ». Chez ces souris, les régions variables murines ont été remplacées par les régions équivalentes humaines des chaînes lourdes et légères. Ces souris transgéniques seraient indistingables des souris normales, se reproduisant comme ces dernières.

Finalement, les différentes évolutions techniques laissent entrevoir de nouvelles innovations.

Toutefois, un obstacle important devra être franchi, celui du coût des médicaments « biologiques » issus de ces techniques. A court ou moyen terme, il est prévisible que nos systèmes de santé, publics ou privés, pourront difficilement supporter les coûts élevés de ces nouveaux médicaments. Certes, on n'arrête pas un rêve qui marche... encore faut-il que le prix du rêve soit raisonnable. ◊

Xenomouse: a feat for obtaining human antibodies in mice

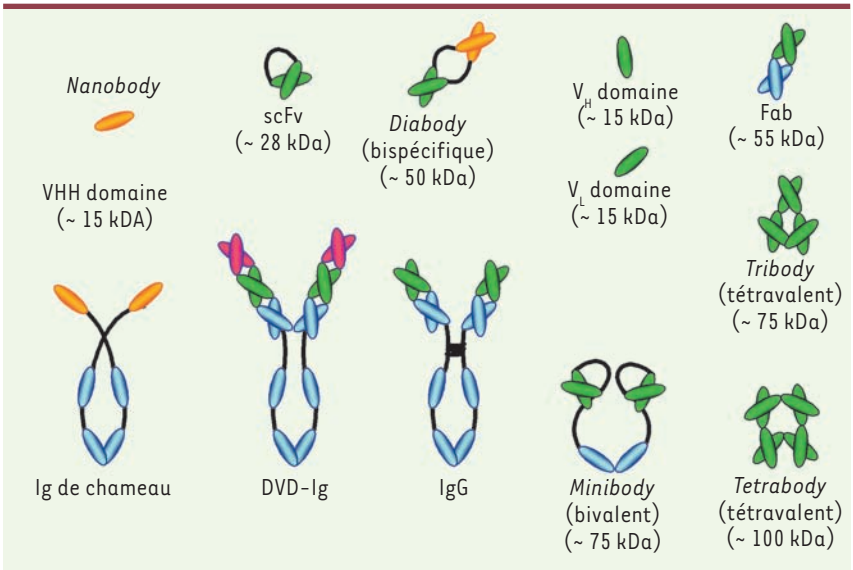


Figure 2. ***Quelques constructions ou fragments d'anticorps en essais cliniques ou susceptibles d'être utilisés en clinique.***

RÉFÉRENCES

1. Bellet D, Dangles-Marie V. Anticorps humanisés en thérapeutique. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 1054-62.
2. Narayanan R, Kuppermann BD, Jones C, Kirkpatrick P. Ranibizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2006 ; 5 : 815-6.
3. Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1134-43.
4. Saltz L, Easley C, Kirkpatrick, P. Panitumumab. *Nat Rev Drug Discov* 2006 ; 5 : 987-8.
5. Scott CT. Mice with a human touch. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1075-7.
6. Ehrlich P, Herta CA, Shigas K. Über einige verwendungen der naphtochinosuflsaure. *Z Physiol Chem* 1904 ; 61 : 379-92.
7. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1126-36.
8. Baker M. Upping the ante on antibodies. *Nat Biotechnol* 2005 ; 23 : 1065-72.
9. Wu C, Ying H, Grinnell C, *et al.* Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1290-7.
10. Sidhu SS, Fellouse FA. Synthetic therapeutic antibodies. *Nat Chem Biol* 2006 ; 2 : 682-8.
11. Behar-Cohen F, Sennlaub F, Berdugo M. Espoirs thérapeutiques dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 127-9.

Nouvelles.indd 905 29/10/2008 14:34:01

FoxP2, un gène qui fait parler l'homme et chanter les oiseaux

Christelle Rochefort

Neurobiologie de l'Apprentissage, de la Mémoire et de la Communication (NAMC), CNRS UMR 8620, Université Paris Sud, Bâtiment 446, 91405 Orsay France.
christelle.rochefort@u-psud.fr

De la famille KE... aux oiseaux chanteurs

Le langage permet l'expression de la pensée et par la même représente une forme de communication unique à l'Homme. Si les voies cérébrales impliquées dans son acquisition ont été décrites de façon approfondie, l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine du langage est en revanche très limitée. Néanmoins, des recherches de liaison génétique effectuées sur trois générations d'une famille anglaise, connue sous le nom de « famille KE », ont récemment ouvert des pistes particulièrement intéressantes quant aux processus neuronaux du langage. En effet, près de la moitié des membres de cette famille présentent des troubles héréditaires du langage qui se traduisent par une difficulté d'élocution liée à des déficits de mouvements séquentiels de la bouche nécessaires à l'articulation de la parole (dyspraxie verbale) ainsi que des carences grammaticales [1]. Les investigations génétiques de ces patients ont conduit pour la première fois à l'identification d'un gène unique lié à certains troubles du langage : le facteur de transcription FoxP2 (pour *forkhead box P2*) [2]. Depuis, des études d'imagerie fonctionnelle chez la famille KE [3] ainsi que des analyses génétiques d'autres patients présentant des déficits du langage et de la grammaire similaires à ceux de la famille KE [4] ont renforcé l'idée selon laquelle FoxP2 jouerait un rôle déterminant dans le développement des structures neurales impliquées dans la parole et le langage. Ainsi, les investigations sur la famille KE ont permis d'ouvrir une formidable piste d'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents à la fonction du langage.

Afin d'analyser de façon plus approfondie la contribution de FoxP2 dans les mécanismes sensori-moteurs permettant le développement du langage, il est nécessaire de disposer de modèles animaux adaptés. Or, l'apprentissage vocal, qui représente une composante du langage, se retrouve chez certaines espèces animales dont les oiseaux chanteurs. Ces derniers, à l'instar des êtres humains, acquièrent les sons qui constitueront leur chant en imitant ceux émis par leurs aînés. En d'autres termes, ces oiseaux sont capables de modifier des vocalisations innées pour copier ou créer de nouveaux sons. L'utilisation de ce modèle est d'autant plus pertinente que d'autres parallèles entre la parole humaine et le chant d'oiseau ont pu être établis et incluent l'importance d'une période critique précoce permettant l'apprentissage du chant ainsi que des similitudes dans les circuits cérébraux impliqués dans l'apprentissage et la production des sons [5].

FoxP2 et l'apprentissage du chant chez le diamant mandarin

Le laboratoire du Professeur Constance Scharff utilise le diamant mandarin, une espèce d'oiseau chanteur qui possède un chant quasiment invariable à l'âge adulte, pour examiner le rôle de FoxP2 dans l'apprentissage du chant. Les membres de cette équipe ont notamment montré que, chez les mâles juvéniles, l'expression de l'ARNm de FoxP2 augmente significativement pendant la période sensible d'apprentissage vocal dans l'aire X, un noyau de la partie antérieure du cerveau aviaire appartenant au circuit cérébral impliqué dans l'apprentissage du chant [6]. Afin de mettre en évidence un éventuel lien causal entre l'expression de FoxP2 dans l'aire X et l'apprentissage vocal chez des diamants mandarins juvéniles, le Pr Scharff et ses collègues ont ensuite modifié expérimentalement le niveau d'expression de FoxP2 dans ce noyau, *via* une stratégie basée sur l'interférence ARN couplée à l'utilisation d'un vecteur lentiviral. Cette technique, qui n'avait encore jamais été utilisée dans un cerveau aviaire, est basée sur la propriété des ARN interférentiels à provoquer la destruction des ARNm dont la séquence nucléotidique leur est complémentaire, ce qui a pour conséquence de bloquer la production de la protéine correspondante. L'injection d'un lentivirus contenant un ARN interférentiel anti-FoxP2 dans l'aire X, au début de la période critique de plasticité vocale, a donc permis une inhibition locale de FoxP2 pendant la totalité de la période d'apprentissage vocal [7]. Les oiseaux ainsi traités présentent des déficits d'apprentissage du chant par rapport à des oiseaux injectés avec un lentivirus contrôle ne reconnaissant aucun gène aviaire *(Figure 1)*. En effet, chez les oiseaux présentant une diminution de FoxP2, l'imitation du chant du tuteur est non seulement incomplète, mais également imparfaite, puisque la copie des syllabes est souvent inexacte *(Figure 1)*. De plus, ces oiseaux présentent également un chant relativement instable à l'âge adulte [7].

Un rôle de FoxP2 à l'âge adulte ?

Cette étude a donc mis en évidence que l'expression de FoxP2 est critique pour l'acquisition correcte du chant. De plus, sa fonction ne semble pas limitée à la seule mise en place des circuits céré-

Nouvelles.indd 906 29/10/2008 14:34:01

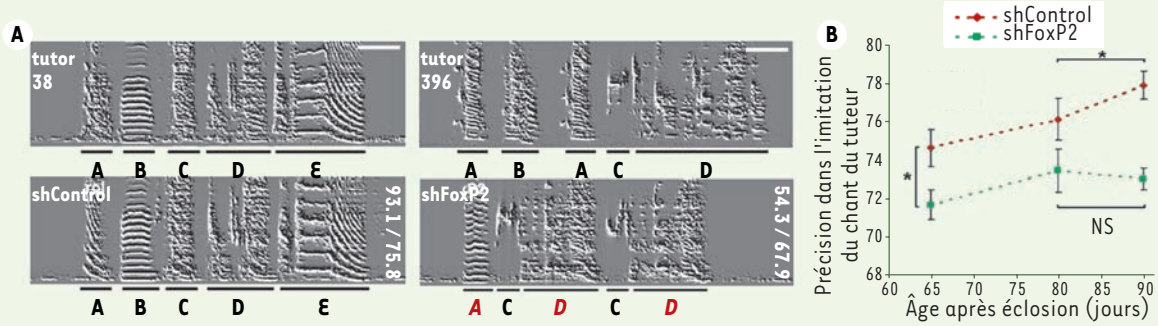


Figure 1. ***Défauts d'apprentissage du chant chez des oiseaux juvéniles dont l'expression de FoxP2 est bloquée dans l'aire X. A.*** Sonogrammes représentant le motif chanté par des diamants mandarins, tuteurs (en haut) ou « élèves » (en bas). Chaque motif est composé d'une suite de syllabes, soulignées en noir et codées par des lettres. Les juvéniles déficients en FoxP2 (shFoxP2) apprennent le motif du tuteur de manière incomplète et inexacte : certaines syllabes ne sont pas copiées (syllabe B) et d'autres sont imitées de façon peu précise (lettres rouges en italique). ***B.*** Graphique illustrant le score de précision de l'imitation, par les juvéniles, du chant de leur tuteur. Chez les élèves shFoxP2, le déficit d'imitation du chant est visible tout au long de la période d'apprentissage vocal. NS : non significatif. * $p < 0,05$ (adapté de [7]).

braux au cours du développement dans la mesure où la diminution expérimentale de FoxP2 n'a été déclenchée qu'à partir de la troisième semaine post-natale. Par conséquent, ces données offrent une nouvelle possibilité d'interprétation des troubles du langage chez les individus portant une mutation de FoxP2, associés jusqu'à présent à des déficits de développement embryonnaire [3, 8]. De manière intéressante, il a été montré que FoxP2 continue d'être exprimé et régulé chez le diamant mandarin et le canari adultes, lors du comportement de chant [6, 9]. L'hypothèse la plus probable serait donc que, outre le rôle de FoxP2 dans le développement embryonnaire de circuits cérébraux sous-jacents au langage, ce gène soit également impliqué à un stade plus tardif dans les aptitudes sensori-motrices. Toutefois, les travaux de l'équipe du Pr. Scharff ne permettent pas de préciser le rôle postnatal de FoxP2. Il reste notamment à distinguer si FoxP2 est important pour la production motrice ou pour l'apprentissage moteur. Des expériences d'inhibition de FoxP2 à l'âge adulte, une fois la période critique d'apprentissage révolue, pourront certainement permettre d'établir une distinction entre ces deux processus. ◊

The *FoxP2* gene makes humans speak… and birds twitter

RÉFÉRENCES

1. Vargha-Khadem F, Gadian DG, Copp A, Mishkin M. FOXP2 and the neuroanatomy of speech and language. *Nat Rev Neurosci* 2005 ; 6 : 131-8.
2. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, *et al*. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature* 2001 ; 413 : 519-23.
3. Liégeois F, Baldeweg T, Connelly A, *et al*. Language fMRI abnormalities associated with FOXP2 gene mutation. *Nat Neurosci* 2003 ; 6 : 1230-7.
4. MacDermot KD, Bonora E, Sykes M, *et al*. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am J Hum Genet* 2005 ; 76 : 1074-80.
5. Doupe AJ, Kuhl PK. Birdsong and human speech : common themes and mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 1999 ; 22 : 567-631.
6. Haesler S, Wada K, Nshdejan A, *et al*. FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. *J Neurosci* 2004 ; 24 : 3164-75.
7. Haesler S, Rochefort C, Georgi B, *et al*. Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS Biol* 2007 ; 5 : e 321.
8. Watkins KE, Dronkers NF, Vargha-Khadem F. Behavioural analysis of an inherited speech and language disorder : comparison with acquired aphasia. *Brain* 2002 ; 125 : 452-64.
9. Teramitsu I, White SA. FoxP2 regulation during undirected singing in adult songbirds. *J Neurosci* 2006 ; 26 : 7390-4.

Nouvelles.indd 907 29/10/2008 14:34:02

La biogenèse du VIH-1 dévoilée

Nolwenn Jouvenet

Aaron Diamond AIDS Research Center,
Laboratory of Retrovirology, The Rockefeller University,
455 1st Avenue, 10016 New York, États-Unis.
njouvene@adarc.org

> Les récentes avancées technologiques d'imagerie cellulaire ont permis de visualiser de nombreuses étapes de la réplication des virus dans des cellules vivantes. Ainsi, en fusionnant certaines protéines virales à des protéines fluorescentes, l'attachement, la pénétration et le transport de virus dans leurs cellules hôtes ont pu être caractérisés au cours des dernières années [1]. Cependant, la biogenèse de nouveaux virus, une étape clé de la réplication virale, n'avait pas encore été visualisée jusqu'à ce jour.

Assemblage plasmique des molécules Gag de VIH-1

La biogenèse d'un virus consiste en l'adressage des composants du virus en un site cellulaire particulier, où ces composants s'assemblent pour former de nouvelles particules virales qui seront ultérieurement libérées dans le milieu extérieur [2]. Dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), l'assemblage a lieu à la membrane plasmique des cellules hôtes [3-5]. La protéine virale Gag, qui est le composant principal du VIH-1, orchestre ce processus : son expression est suffisante pour engendrer la formation de nouveaux virus. La concentration et l'assemblage compact de plusieurs milliers de copies de la protéine Gag sous la membrane plasmique entraînent la déformation de celle-ci, jusqu'à l'obtention d'une vésicule d'une centaine de nanomètres de diamètre qui bourgeonne vers le milieu extérieur, puis se sépare de la cellule. Cette séparation est dépendante de l'interaction entre Gag et le complexe protéique ESCRT *(endosomal sorting complex required for transport)*, ce dernier étant impliqué dans les séparations de membranes cellulaires, comme le bourgeonnement des vésicules internes des endosomes multivésiculaires [6], ou encore la séparation des membranes de 2 cellules filles après la division cellulaire [7]. Toutes les connaissances de la biogenèse virale sont déduites d'études biochimiques effectuées sur des populations de virus et de l'observation microscopique de virus dans des cellules fixées. Tous les aspects cinétiques de l'assemblage sont donc encore inconnus.

L'onde évanescente de TIR-FM pour une imagerie de la membrane à haute résolution

Afin d'y remédier, nous avons travaillé avec des cellules vivantes exprimant la protéine Gag fusionnée à la protéine fluorescente verte (Gag-GFP) et utilisé une technique de microscopie qui permet d'étudier avec une très grande résolution les évènements intervenant à la membrane plasmique [8]. Le principe de cette technique, appelée TIR-FM *(Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy)* est d'illuminer l'échantillon avec une lumière dont l'angle d'incidence est tel que la lumière va être entièrement réfléchie à l'interface cellule/support en verre. Cela génère une onde évanescente faible qui pénètre dans le milieu dont l'indice de réfraction est le moins élevé (dans ce cas, la cellule) jusqu'à une distance de quelques centaines de nanomètres. En comparaison avec l'imagerie conventionnelle à champ large et même l'imagerie confocale, le contraste des images obtenues, ainsi que le rapport signal/bruit de fond sont considérablement améliorés *(Figure 1)*. Cette technique a été développée dans les années 1980, et elle est communément utilisée en biologie cellulaire pour étudier les évènements moléculaires qui ont lieu

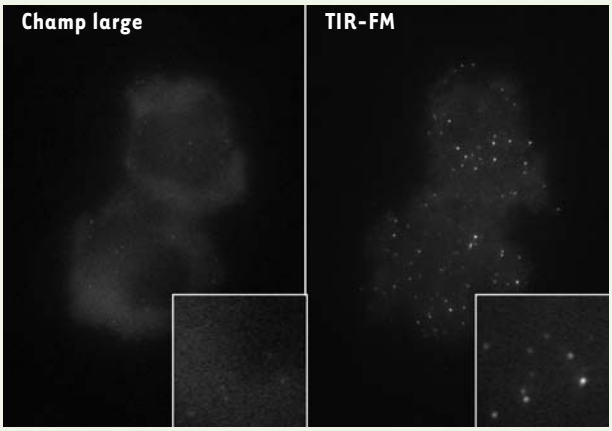


Figure 1. ***Visualisation des particules virales à la membrane plasmique avec la technique du TIR-FM.*** Une cellule vivante exprimant les protéines Gag et Gag-GFP est photographiée avec un microscope à fluorescence utilisé soit en mode conventionnel « champ large » (à gauche), soit en mode TIR-FM (à droite). La mise au point est inchangée entre les 2 prises de vues.

Nouvelles.indd 908 29/10/2008 14:34:02

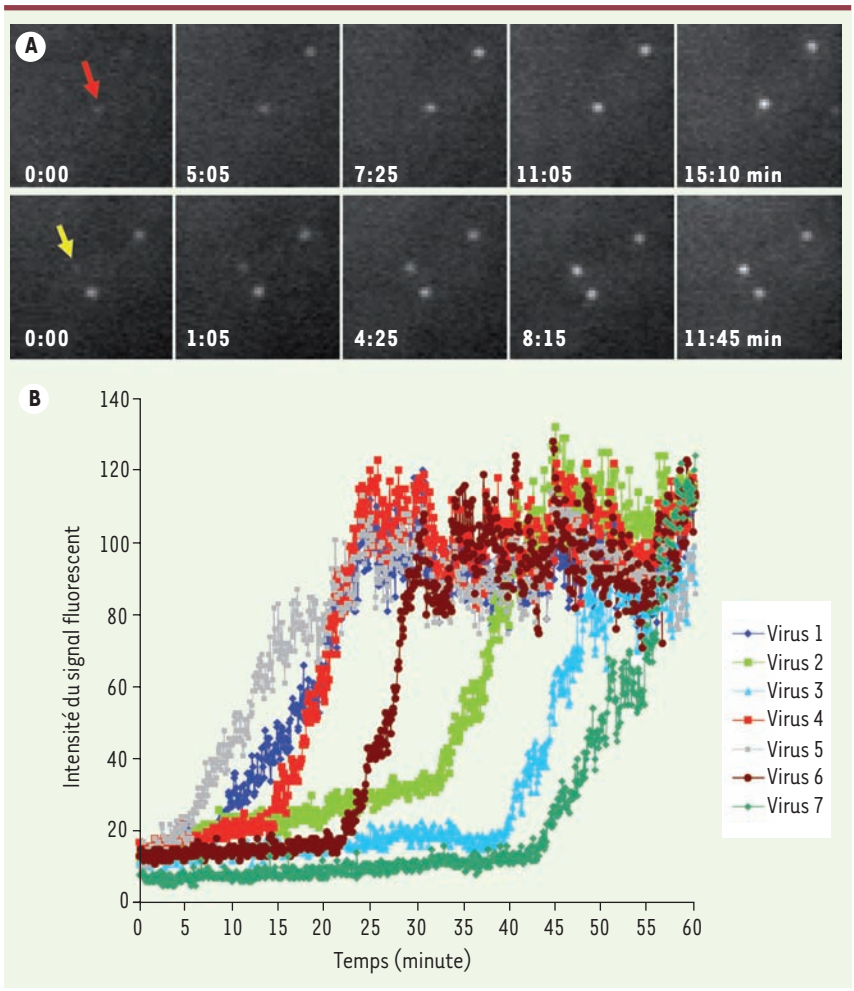


Figure 2. ***Assemblage du VIH-1 en temps réel.*** Des cellules vivantes exprimant les protéines Gag et Gag-GFP sont photographiées toutes les 5 secondes pendant 60 minutes. ***A.*** La suite d'images acquises par TIR-FM montre l'apparition de 2 virus fluorescents (flèches) à la membrane plasmique. Le temps est indiqué en minutes : secondes. ***B.*** Les courbes illustrent l'évolution du signal fluorescent émis par Gag-GFP pendant l'assemblage de 7 virus à la surface d'une cellule. L'intensité du signal fluorescent est calculée par le logiciel Metamorph ; elle est donnée en unités arbitraires.

à la surface des cellules ; par exemple, les mécanismes d'endocytose et d'exocytose [8].

Capturer l'assemblage des virus en temps réel : FRET et FRAP

Nous avons ainsi détecté avec une résolution sans précédent les virus fluorescents à la membrane plasmique *(Figure 1)* [9]. L'une des principales difficultés était de capturer l'assemblage des virus « en direct ». Nous savions, grâce à nos travaux biochimiques, que quelques heures seulement après leur expression, les protéines Gag sont présentes sous forme soluble dans le cytoplasme et que, 1 à 2 heures plus tard, elles sont concentrées à la membrane plasmique où l'assemblage a lieu [3]. En observant des centaines de cellules à ce moment précis, et en les photographiant toutes les 5 secondes pendant 60 minutes, nous avons pu détecter l'apparition de milliers de virus fluorescents à la membrane plasmique *(Figure 2A)*. Pendant chacune de ces apparitions, le signal fluorescent émis par les protéines Gag augmentait régulièrement pendant plusieurs minutes, puis se stabilisait *(Figure 2B)*. L'augmentation régulière du signal fluorescent représente très probablement la concentration et l'assemblage des protéines Gag à la surface des cellules.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé la technique du FRET *(Fluorescence Resonance Energy transfer)*. Celle-ci est basée sur les transferts d'énergie entre 2 protéines fluorescentes, par exemple la GFP et mCherry (qui émet une fluorescence rouge), et elle informe sur la proximité des protéines fusionnées à ces fluorophores [10]. En effet, plus les protéines sont rapprochées, plus les transferts d'énergie de GFP vers mCherry sont importants et plus mCherry fluoresce. Le niveau de FRET se mesure par le rapport entre le signal fluorescent émis par GFP et celui émis par mCherry. Pendant l'apparition des virus à la membrane plasmique, le niveau de FRET au sein de chaque virus augmente régulièrement pendant quelques minutes, puis il se stabilise, jusqu'à atteindre un niveau comparable à celui mesuré dans les virus libérés dans le surnageant de culture [9]. Ces données indiquent que pendant l'apparition de ces virus, les protéines Gag deviennent de plus en plus proches les unes des autres, pour atteindre un degré de concentration aussi élevé que celui détecté dans des virus complètement assemblés.

La technique du FRAP *(Fluorescence Recovery after Photobleaching)* a ensuite permis de mettre en évidence le recrutement actif de nouvelles protéines Gag durant ces apparitions [9]. En effet, si les particules virales sont soumises pendant leur formation à une forte application laser qui détruit irréversiblement la GFP, la fluorescence réapparaît toujours. En revanche, il n'y a pas de réapparition de fluorescence pour les virus dont la fluorescence était stable avant le photoblanchiment. Ces données indiquent que de nouvelles protéines Gag sont recrutées pendant l'apparition de chacun de ces virus et que la stabilisation du signal

Nouvelles.indd 909 29/10/2008 14:34:03

fluorescent correspond à l'arrêt du recrutement et donc, trés probablement, à l'arrêt de l'assemblage des virus.

Biogenèse du VIH-1 : une question de minutes

Les résultats des expériences de FRET et de FRAP nous ont convaincus que les évènements que nous visualisions étaient de véritables événements d'assemblage. Nous avons alors mesuré la durée de formation de centaines de virus et nous avons ainsi déterminé que la biogenèse du VIH-1 nécessite 5 à 6 minutes. Cependant, de manière surprenante, une fois l'assemblage achevé, la grande majorité des virus restaient immobiles dans le champ de vision. Afin de nous assurer que ces virus étaient correctement libérés de la membrane plasmique, nous avons fusionné Gag à la protéine Phluorin, une variante de la GFP dont l'intensité d'émission est optimale à pH 7,5 et diminue avec l'acidification [11]. Une acidification rapide du cytoplasme des cellules peut être induite en exposant le milieu de culture à du CO_2 concentré à 100 % pendant 20 secondes [12]. En étudiant les conséquences de cette acidification sur la fluorescence de centaines de virus composés de milliers de copies de Gag-Phluorin, nous avons pu distinguer les virus qui étaient encore attachés à la cellule (ceux dont la fluorescence était très sensible aux changements de pH) de ceux qui avaient bourgeonné (ceux dont la fluorescence était peu sensible aux changements de pH du cytoplasme puisque séparés de la cellule) [9]. La présence des virus dans le champ après leur bourgeonnement peut s'expliquer par leur immobilisation entre les cellules et leur support ou par leur rétention à la membrane par la protéine Tetherin [13].

Nous avons ainsi établi un système original permettant de visualiser l'assemblage de particules virales en temps réel. En visualisant simultanément Gag et d'autres composants clés du virus, comme le matériel génétique ou la protéine de l'enveloppe, ou encore Gag et le complexe protéique ESCRT, nous devrions être capable d'approfondir nos connaissances sur l'assemblage et le bourgeonnement du VIH-1. Nous espérons également utiliser ce système pour étudier la biogenèse d'autres types de virus. ◊

HIV-1 biogenesis unmasked

REMERCIEMENTS

Je remercie Paul Bieniasz et Sanford Simon pour la supervision de ces recherches, Véronique Douard pour la relecture pertinente de cette nouvelle, ainsi que l'amfAR (Foundation for AIDS Research) pour l'attribution d'une bourse postdoctorale « Mathilde Krim ».

RÉFÉRENCES

1. Brandenburg B, Zhuang X. Virus trafficking : learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol* 2007 ; 5 : 197-208.
2. Corbin A, Grigorov B, Roingeard P, *et al*. Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 49-55
3. Jouvenet N, Neil SJ, Bess C, *et al*. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* 2006 ; 4 : e435.
4. Welsch S, Keppler OT, Habermann A, *et al*. HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e36.
5. Finzi A, Orthwein A, Mercier J, Cohen EA. Productive human immunodeficiency virus type 1 assembly takes place at the plasma membrane. *J Virol* 2007 ; 81 : 7476-90.
6. Von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, *et al*. The protein network of HIV budding. *Cell* 2003 ; 114 : 701-13.
7. Carlton JG, Martin-Serrano J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding : a role for the ESCRT machinery. *Science* 2007 ; 316 : 1908-12.
8. Jaiswal JK, Simon SM. Imaging single events at the cell membrane. *Nat Chem Biol* 2007 ; 3 : 92-8.
9. Jouvenet N, Bieniasz PD, Simon SM. Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* 2008 ; 454 : 236-40.
10. Trugnan G, Fontanges P, Delautier D, Ait-Slimane T. FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleur ! *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 1027-34.
11. Miesenbock, G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 1998 ; 394 : 192-5.
12. Simon S, Roy D, Schindler M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 1128-32.
13. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008 ; 451 : 425-30.

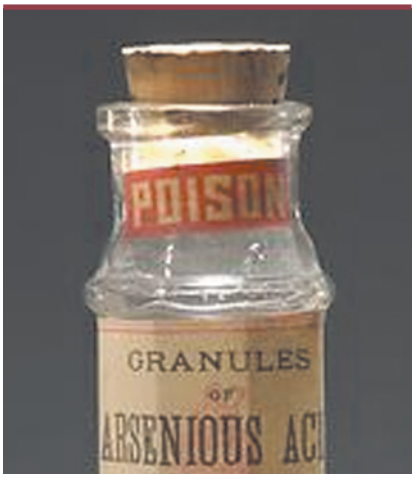
Nouvelles.indd 910 29/10/2008 14:34:07

Empoisonnement du riz par l'arsenic

Dominique Labie

Département de génétique, développement et pathologie moléculaire, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
dominique.labie@inserm.fr

> Le riz est la nourriture de base de la moitié de l'humanité, presque exclusive pour de nombreuses populations. On conçoit la gravité d'une concentration d'arsenic (As) très au dessus des 50 µg/kg préconisés par l'OMS. Les travaux consacrés récemment à ce problème sont multiples, bilan épidémiologique, explication des mécanismes en cause, origine hydrique de la contamination. La constatation de cette contamination a été faite majoritairement dans le Sud-Est asiatique et en Chine, mais parfois confirmée dans des cultures américaines ou européennes. Un article de *Science* se focalise sur le risque de cancer dû à la concentration de As dans le riz non décortiqué (*paddy rice*) [1]. L'As y est sous forme non organique, arsenate et arsenite. Dans les régions minières de Chine l'on trouve des taux atteignant 700 µg/kg (*versus* 150 µg/kg admis) qui se concentrent dans le *paddy rice* [2]. Une consommation moyenne de 200 grammes de riz par jour peut entraîner des cancers de la peau ou de la vessie. L'assimilation de As par le riz est très supérieure à celle du blé ou de l'orge. L'As a même été retrouvé dans des produits industrialisés tels que les aliments pour bébé. Un travail japonais publié dans les *Proc Natl Acad Sci USA* a plus spécifiquement étudié la nature des transporteurs qui permettent cette accumulation d'arsenite dans le riz [3]. Cette recherche a été faite par comparaison avec le transport par aquaglycéroporine observé dans les bactéries. Ces transporteurs, de la famille des aquaporines, font partie des *nodulin 26-like intrinsic membrane proteins* (NIP) et fonctionnent en 2 étapes. Le transporteur NIP Lst1, actif dans le transport de l'acide silicique, serait le transporteur d'influx d'As dans le riz [4]. Cet effet d'influx de Lst1 vers les cellules ectodermiques et endodermiques de la racine du riz a été contrôlé par comparaison avec un mutant déficient *lst1*, et la spécificité de *Lst1* vérifiée parmi une dizaine de NIP [5]. Le passage de la racine vers le canal central (*stele*) puis le tissu parenchymateux nécessite ensuite un transporteur d'efflux. Un autre transporteur de l'acide silicique, Lst2, a été identifié dans la racine du riz, et son rôle d'efflux contrôlé grâce à un mutant inactif *lst2*. Le rôle de Lst2 dans la concentration d'As dans les grains de riz est en définitive crucial, plus important que celui de Lst1. Là est la différence majeure avec le transport dans les organismes bactériens, chez lesquels seul un influx est nécessaire et observé. Les auteurs insistent sur le paradoxe et la difficulté de cibler un transporteur d'acide silicique bénéfique mais qui est aussi toxique comme transporteur d'arsenic.



Une dernière série de travaux a recherché l'origine de l'As au niveau des nappes phréatiques. La contamination de l'eau est massivement observée au niveau du delta des grands fleuves asiatiques, Gange, Irrawady, Mékong. C'est dans le delta du Mékong, moins perturbé par l'irrigation, qu'une étude a été menée par des chercheurs de la *Stanford University* [6]. On avait constaté des taux d'As variables d'un puits à un autre, même très proches l'un de l'autre, variabilité apparemment imprévisible. Les auteurs ont démontré l'origine spontanée de l'As dans les sédiments de l'Himalaya, sa libération du milieu solide se faisant en anaérobiose. La géologie du terrain comporte ~ 40 mètres d'épaisseur de terrains poreux au-dessus de ~ 15-20 mètres de limon glaiseux. La libération d'As soluble en anaérobiose a lieu dans les bassins d'eaux stagnantes, naturels ou artificiels. La nature géologique du sol fait que la circulation dans le sol poreux est horizontale. Les puits explorent des couches géologiques et, au niveau d'un

Nouvelles.indd 911 29/10/2008 14:34:07

puits, les zones les plus profondes correspondent donc à des sources plus éloignées. La composition chimique reflète les origines différentes de l'eau dans chacune des couches, et non une variation continue en fonction de l'âge. C'est la couche formée au niveau des eaux stagnantes anaérobies où est trouvée la concentration d'As la plus élevée, que devrait éviter le puits. Y a-t-il possibilité d'une stratégie exploitant ces données [7] ? Elle serait sûrement d'un coût élevé dans des zones aussi denses et irriguées que les deltas du Gange ou de l'Irrawady, mais valent d'être envisagées en considérant la gravité dramatique des intoxications à l'As. ◊

Rice poisoning by arsenic

RÉFÉRENCES

1. Stone R. Food safety. Arsenic and paddy rice : a neglected cancer risk? *Science* 2008 ; 321 : 184-5.
2. Zhu YG, Sun GX, Lei M, *et al*. High percentage inorganic arsenic content of mining impacted and nonimpacted Chinese rice. *Environ Sci Technol* 2008 ; 42 : 5008-13.
3. Ma JF, Yamaji N, Mitani N, *et al*. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 9931-5.
4. Ma JF, Tamai K, Yamaji N, *et al*. A silicon transporter in rice. *Nature* 2006 ; 440 : 688-91.
5. Mitani N, Yamaji N, Ma JF. Characterization of substrate specificity of a rice silicon transporter, Lsi1. *Pflugers Arch* 2008 ;456 : 679-86.
6. Polizzotto ML, Kocar BD, Benner SG, *et al*. Near-surface wetland sediments as a source of arsenic release to ground water in Asia. *Nature* 2008 ; 454 : 505-8.
7. Harvey CF. Environmental science : poisoned waters traced to source. *Nature* 2008 ; 454 : 415-6.

NOUVELLE

Lost after translation

Jean-Claude Kaplan

Professeur émérite à la Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.
jean-claude.kaplan@inserm.fr

Un allèle faux-sens se comportant comme un allèle nul

Le numéro de mars 2008 du journal *Human Molecular Genetics* contient deux articles [1, 2] portant sur la pathogénicité de la mutation faux-sens R77C dans le gène de l'alpha-sarcoglycane (*SGCA*). La pathologie de ce gène entraîne chez l'homme une dystrophie musculaire progressive de sévérité variable [5-8]. Rappelons que les 4 sarcoglycanes (α, β, γ et δ–SG) sont des protéines monomériques transmembranaires à un seul passage et O-glycosylées sur leur versant extracellulaire. Elles s'associent pour former le complexe des sarcoglycanes (SG) faisant lui-même partie du complexe DGC (*Dystrophin glycoprotein complex*) (*Figure 1*). L'ensemble assure l'amarrage du cytosquelette de la cellule musculaire aux protéines de la matrice extracellulaire, *via* l'axe dystrophine-dystroglycanes [9,10]. Le mode d'assemblage de cet édifice sarcolemmique a été éclairci [11, 12]. Les mutations touchant n'importe lequel des 4 gènes du complexe SG provoquent un démantèlement de tout l'édifice, et il s'ensuit une dystrophie musculaire des ceintures de transmission autosomique récessive, désignée LGMD2D, E, C, F selon le gène en cause [8, 13]. On ne dispose encore d'aucun traitement pour ces myopathies C'est la pathologie du gène *SGCA* (LGMD2D, OMIM #608099) qui est la plus fréquente [14]. Chez la souris, le *knock-out* du gène *Sgca* a déjà été effectué (souris $Sgca^{Null/Null}$), de même que celui des 3 autres gènes de sarcoglycane, réalisant dans tous les cas un phénotype de dystrophie musculaire sévère [15, 16]. Or, en pathologie humaine, la majorité des mutations du gène *SGCA* sont des faux-sens affectant le domaine extracellulaire [17]. Parmi celles-ci, la mutation c.229C>T au niveau d'un CpG de l'exon 3, qui induit le remplacement en position 77 d'une arginine par une cystéine (R77C), est remarquablement récurrente puisqu'on la trouve sous nos latitudes chez plus d'un tiers des malades [6, 17]. Chez ceux-ci, le transcrit muté est en quantité normale, mais au niveau du sarcolemme la protéine est absente ou très diminuée, ce qui suggère une instabilité du produit fini ou une anomalie de maturation. Pour préciser la pathogénie et disposer d'un modèle thérapeutique il était donc logique de créer par *knock-in* une souris portant la mutation faux-sens prédominante dans les α-sarcoglycanopathies humaines.

Les souris $Sgc^{H77C/H77C}$ sont asymptomatiques

L'alpha-sarcoglycane est très conservée au cours de l'évolution, mais chez la souris l'acide aminé en position 77 est une histidine au lieu d'une arginine, ce qui n'affecte pas la charge positive du résidu. Les deux équipes mentionnées ci-dessus [1, 2] ont effectué avec succès le remplacement du résidu His par le résidu Cys dans le gène murin. À leur grande surprise les souris obtenues ($Sgca^{H77C/H77C}$) ne manifestent aucun symptôme clinique ou histologique de dystrophie musculaire, et la protéine mutée est normalement exprimée et positionnée au niveau du sarcolemme. Cela contraste avec la pathologie généralement sévère observée chez les malades homozygotes pour la mutation R77C [6, 7].

Nouvelles.indd 912 29/10/2008 14:34:11

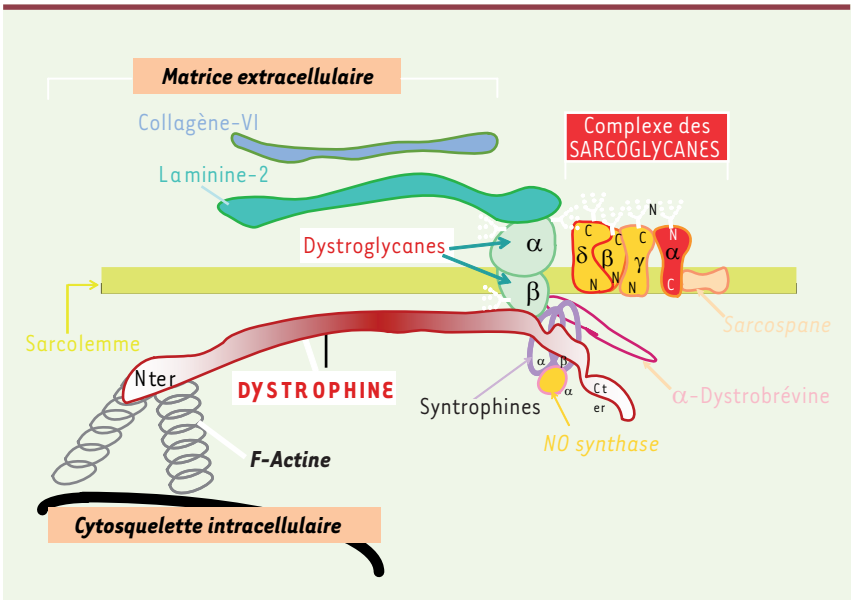


Figure 1. ***Schéma simplifié de la*** **dystrophin connection.** Seules sont représentés les partenaires les plus directs. Les arborescences violettes symbolisent les restes O-glycosylés. La mutation R77C porte sur le gène de l'α-sarcoglycane (en rouge) (modifié d'après [36]).

La protéine α-SG humaine R77C est bel et bien fabriquée mais elle est perdue en cours de route

L'équipe d'Isabelle Richard [2] en apporte la preuve expérimentale grâce à des expériences de complémentation hétérospécifique effectuées *ex vivo*. Des rétinoblastes embryonnaires humains, normalement dépourvus de sarcoglycanes (lignée HER911), sont d'abord cotransfectés avec des plasmides contenant l'ADNc des β-, γ- et δ-SG humaines, puis complémentés avec un plasmide contenant l'ADNc de l'α-SG humaine, dans sa version normale, ou mutée R77C. La version non mutée de l'ADNc de l'α-SG permet d'obtenir une reconstitution du complexe des quatre SG au niveau de la membrane plasmique. Cette restauration n'est pas obtenue avec la version R77C. Mais, si les cellules sont perméabilisées pour permettre l'accès des anticorps aux antigènes présents à l'intérieur de la cellule, on retrouve la protéine R77C dans l'appareil sécrétoire intracellulaire où elle s'est accumulée. Ce résultat suggère une physio-pathologie par anomalie de maturation empêchant la protéine d'arriver à sa destination finale. En fait, la preuve d'une rétention de la protéine R77C immature dans le compartiment du réticulum endoplasmique (ER) avait déjà été bien documentée par Draviam *et al*. [18], grâce au marquage moléculaire par la GFP de la protéine normale et mutée, dans un autre système de cellules humaines (HK293). Ce travail avait en outre permis de reconstituer le parcours effectué par l'allèle normal depuis le ribosome jusqu'au sarcolemme *via* le système ER, puis le Golgi et le système de transport microtubulaire [18]. Fait intéressant, la protéine α-SG n'a pas besoin de ses partenaires β, γ et δ-SG pour migrer à la membrane, mais elle en a besoin pour s'y maintenir de façon stable, ce qui confirme que la mutation R77C n'affecte pas les interactions avec les autres membres du complexe [18].

Sauvetage de l'allèle R77C par relaxation du contrôle de qualité ERAD

Rappelons que la maturation post-traductionnelle des glycoprotéines exportées a lieu dans le réticulum endoplasmique, et permet aux chaînes polypeptidiques naissantes d'acquérir une configuration finale correcte, seule forme exportable vers sa destination subcellulaire finale (ici le sarcolemme). Le processus comporte un contrôle de qualité au cours duquel les protéines n'ayant pas acquis une configuration normale sont détectées, reconduites à la frontière ER/cytosol, et expulsées par rétrotranslocation vers le cytosol où elles sont détruites dans le protéasome 26S [34, 35]. Ce système, appelé ERAD pour *endoplasmic reticulum associated degradation* est d'une grande complexité, et met en jeu au moins 15 protéines différentes. Il a donné lieu à une abondante littérature à partir des années 1980 (pour revues, *voir* [19, 20]). La *Figure 2* et l'*Encadré* en schématisent les grands traits. Ce contrôle de qualité est très tâtillon, car moins de la moitié des protéines normales parviennent à sortir par la bonne porte [34, 35]. On sait depuis longtemps manipuler spécifiquement ces systèmes par des molécules inhibant les enzymes intervenant dans les remaniements de la chaîne oligosaccharidique [21, 22]. Bartoli *et al.* [2] ont essayé ces agents et ont démontré de manière convaincante que la kifunensine, un inhibiteur spécifique de la mannosidase I [21] *(Figure 2)* permet de faire réapparaître l' α-SG R77C à la membrane. Ce résultat spectaculaire a été obtenu non seulement *ex vivo* dans le système cellulaire reconstitué décrit ci-dessus, mais aussi et surtout *in vivo* dans un système hétérologue où des souris *Sgca*$^{-/-}$ reçoivent des injections intramusculaires d'un transgène α-SG humain vectorisé dans l'AAV (*adeno-associated virus*). La version non mutée de l'ADNc permet d'obtenir une restauration du complexe SG sarcolemmique. En revanche la version R77C ne permet pas cette complémentation, sauf si après l'injection du vecteur AAV-R77C les souris reçoivent de la kifunensine administrée par voie intramusculaire. L'effet thérapeutique local est spectaculaire, car l'administration du produit entraîne une reconstitution des complexes protéiques sarcolemmiques, avec un bénéfice cellulaire attesté par le retour de la membrane musculaire à un

Nouvelles.indd 913 29/10/2008 14:34:11

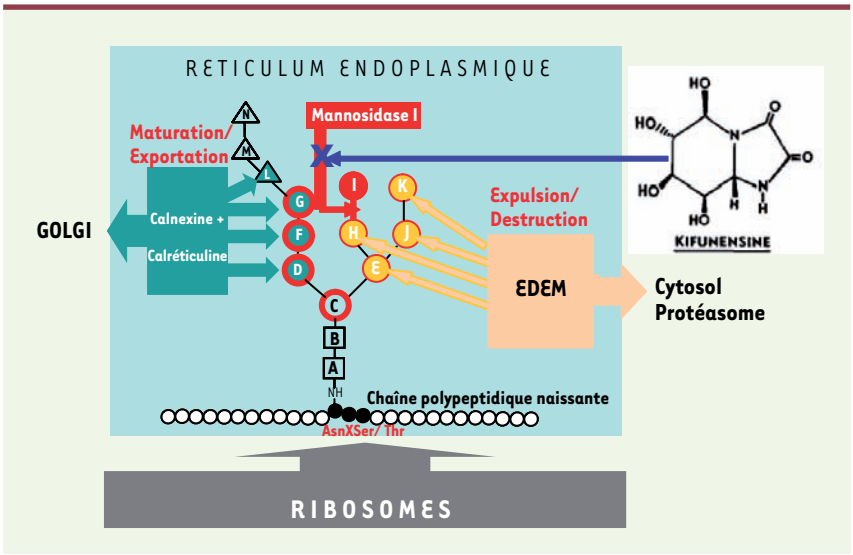


Figure 2. ***La minuterie du système ERAD par la copule N- oligosaccharidique fixée sur la protéine.*** Les carrés A et B : résidus N-acétylglucosamines. Les cercles C à K : restes mannosyl. Les triangles L à N : restes glucosyl. Les résidus figurés en vert interagissent avec les protéines chaperons d'aide à la configuration (calnexine et calréticuline). Les résidus figurés en jaune interagissent avec les protéines chaperons du complexe EDM reconnaissant et expulsant les chaînes malformées, seulement si l'ablation du résidu mannosyl (cercle rouge I) a eu lieu. Les enzymes ne sont pas indiquées à l'exception de la mannosidase I, spécifiquement inhibée par la kifunensine.

état d'imperméabilité au bleu Evans. Ces résultats comportent plusieurs preuves de principe très importantes : (1) l'allèle R77C est bien traduit, mais, au cours de sa maturation, la protéine est retenue et détruite par le système ERAD ; (2) la simple inhibition de la mannosidase I suffit à lui laisser un répit nécessaire pour acquérir une configuration acceptable et quitter le compartiment ER par la bonne porte ; (3) la protéine ainsi soustraite à l'ERAD est pleinement fonctionnelle malgré l'anomalie R77C, ce qui est en accord avec le phénotype normal des souris *Sgca*$^{H77C/H77C}$. Bien sûr, il reste à comprendre la tolérance du modèle murin vis-à-vis du résidu 77C sur sa propre α-SG. Mais le problème principal est d'exploiter les potentialités thérapeutiques de cette découverte.

La pharmacologie à la rescousse des protéines en perdition

La pathogénicité de l'allèle R77C fait entrer la myopathie induite dans la catégorie des « maladies conformationnelles » [23]. On a déjà dénombré plus de 60 maladies dues à une mutation affectant le trafic post-traductionnel [19, 23, 24]. Parmi elles figure notamment la mutation deltaF508 dans le gène *CFTR* qui affecte 2/3 des malades atteints de mucoviscidose [25]. Il est très probable que les nombreuses autres sarcoglycanopathies par mutations faux-sens [17] ressortissent du même mécanisme. Plus généralement on doit y penser chaque fois qu'une mutation faux-sens avec des transcrits en quantité normale se comporte comme un allèle nul ou très diminué, ce qui est la règle plutôt que l'exception [23]. Il faut savoir que l'accumulation d'une protéine malformée dans l'ER est à l'origine d'un stress aux multiples conséquences sur les voies de transduction du signal, pouvant culminer dans un syndrome dit d'UPR (*unfolded protein response*) entraînant la mort cellulaire par apoptose ou autophagie [26, 33]. De ce point de vue, les allèles porteurs de mutations faux-sens seraient pathogènes à la fois par leur absence au bon endroit (LOF), et par la toxicité induite par l'engorgement du compartiment ER (GOF).

Concrètement, ces résultats étant acquis, il va falloir résoudre rapidement le problème de la toxicité de la kifunensine et des autres molécules agissant sur la même cible. En effet à notre connaissance, cet alcaloïde découvert en 1991 dans l'actinomycète *Kitasatosporia kifunense*, [21] n'a jusqu'ici été utilisé qu'*in vitro* ou *ex vivo* [22]. Il est encourageant de noter que dans les expériences rapportées plus haut [2], l'administration par voie intramusculaire n'a pas entraîné chez les souris d'effet néfaste local ou général. Mais si cette stratégie thérapeutique devenait envisageable en clinique, le modèle animal, indispensable pour les analyses précliniques, fait pour le moment défaut. De plus, en provoquant un relâchement de la vigilance du système ERAD on court le risque théorique de laisser échapper non seulement l'allèle désiré mais d'autres espèces malformées dont l'effet pourrait être néfaste. Dans cet ordre d'idée on cherche activement des molécules diffusibles agissant uniquement sur l'allèle pathologique, d'où l'appellation de « *chaperon pharmacologique* » [24, 27]. Cette spécificité a été obtenue, paradoxalement, avec des inhibiteurs compétitifs qui, à faibles doses, se lient à la cible par une liaison de type enzyme-substrat et l'aident à atteindre la configuration normale [28]. Cette approche s'est avérée efficace, notamment dans les maladies lysosomiales dues à des mutations faux-sens, comme la maladie de Fabry (déficit en α–galactosidase) [29]. La recherche pharmacologique dans ce sens va bon train, notamment grâce à l'élaboration de modèles cellulaires se prêtant à un criblage à haut débit [30]. C'est ainsi qu'on vient de découvrir l'effet chaperon de la *pyriméthamine* – un antipaludéen déjà sur le marché – qui secourt efficacement des allèles anormaux de la β-hexosaminidase A en perdition post-traductionnelle. D'où l'espoir de pouvoir traiter les formes tardives de maladies de Tay-Sachs ou de Sandhoff [31].

Nouvelles.indd 914 29/10/2008 14:34:11

Ainsi, après le concept thérapeutique quelque peu simpliste de thérapie génique par un « ADN-médicament », on arrive à la notion de thérapie génétique fondée sur la connaissance des gènes (*gene-based therapy*), de leurs mutations et des différents niveaux de dysfonctions qu'elles engendrent. La pharmacopée des protéines mutées a un bel avenir [32]. ◊

Lost after translation

RÉFÉRENCES

1. Kobuke K, Piccolo F, Garringer KW, *et al.* A common disease-associated missense mutation in alpha-sarcoglycan fails to cause muscular dystrophy in mice. *Hum Mol Genet* 2008 ; 17 : 1201-13.
2. Bartoli M, Gicquel E, Barrault L, *et al.* Mannosidase I inhibition rescues the human [alpha]-sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Hum Mol Genet* 2008 ; 17 : 1214-21.
3. Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 23739-42.
4. Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, *et al.* Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994 ; 78 : 625-33.
5. Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, *et al.* Primary adhalinopathy : a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet* 1995 ; 10 : 243-5.
6. Carrié A, Piccolo F, Leturcq F, *et al.* Mutational diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *J Med Genet* 1997 ; 34 : 470-5.
7. Eymard B, Romero NB, Leturcq F, *et al.* Primary adhalinopathy (alpha-sarcoglycanopathy) : clinical, pathological and genetic correlation in twenty patients with autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1997 ; 4 : 1227-34.
8. Kaplan JC, Beckmann JS, Fardeau M. Limb girdle muscular dystrophies. In : Karpati G, Hilton-Jones D, Griggs R, eds. *Disorders of voluntary muscle*, chapter 20, 7e ed. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 433-63.
9. Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991 ; 66 : 1121-31.
10. Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, *et al* . Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* 2005 ; 32 : 563-76.
11. Holt K, Campbell K. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1998 ; 23 : 34667-70.
12. Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* 2007 ; 8 : 177-83.
13. Lim L, Campbell K. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1998 ; 11 : 443-52.
14. Trabelsi M, Kavian N, Daoud F, *et al.* Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 793-803.
15. Duclos F, Straub V, Moore SA, *et al.* Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998 ; 142 : 1461-71.

L'ERAD : un contrôle temporisé de la qualité conformationnelle des protéines

Dès leur arrivée dans le réticulum endoplasmique les chaînes polypeptidiques naissantes sont pourvues d'une chaîne oligosaccharidique ramifiée fixée par N-glycosylation sur une asparagine contenue dans un motif consensus Asn-X-Ser/Thr. Cette copule, qui comporte 14 restes glucidiques (Glc3Mann9GlcNAc2) *(Figure 2)*, joue un rôle de signal dans le programme de traitement post-traductionnel, en permettant l'association transitoire de protéines chaperonnes. Certaines, se liant aux restes gycosyles, ont un rôle d'assistance au repliement vers une conformation correcte (ensemble calnexine/calréticuline). D'autres comme les EDEM *(ER degradation – enhancing alpha-mannosidase-like protein)*, s'occupant d'éliminer les chaînes malformées, se lient aux résidus mannosyl dans une configuration particulière *(Figure 2)*. Celle-ci n'apparaît que si la protéine naissante tarde à prendre sa conformation finale, ce qui laisse le temps à une mannosidase de type I, très spécifique mais de cinétique lente, d'opérer l'ablation d'un résidu mannosyl décisif, le résidu Man8 (en rouge dans la *Figure 2*). Aussi longtemps que la protéine en cours de maturation conserve ce mannosyl emblématique elle peut subir plusieurs tentatives de reconfiguration et, en cas de réussite, sortir du compartiment ER pour poursuivre sa maturation dans le Golgi. Si les tentatives échouent parce que la protéine possède une structure primaire anormale, ce qui est précisément le cas pour l'allèle R77C, la mannosidase I entre en jeu, représentant une véritable minuterie du séjour protéique dans le compartiment ER. La perte du mannosyl 8 est un signal pour les EDEM qui dirigent les protéines malformées vers la destruction [34, 35].

16. Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex : an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002 ; 12 : 349-61.
17. LOVD. Leiden Muscular Dystrophy pages. http://www.dmd.nl/nmdb/home.php
18. Draviam RA, Wang B, Shand SH, *et al*. Alpha-sarcoglycan is recycled from the plasma membrane in the absence of sarcoglycan complex assembly. *Traffic* 2006 ; 7 : 793-810.
19. Hebert DN , Molinari M. In and out of the ER : protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 2007 ; 87 : 1377-408.
20. Roth J, Yam GH, Fan J, *et al.* Protein quality control : the who's who, the where's and therapeutic escapes. *Histochem Cell Biol* 2008 ; 129 : 163-77.
21. Elbein AD, Kerbacher JK, Schwartz CJ, Sprague EA. Kifunensine inhibits glycoprotein processing and the function of the modified LDL receptor in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1991 ; 288 : 177-84.
22. Tokunaga F, Brostrom C, Koide T, Arvan P. Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 40757-64.
23. Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH. Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006 ; 7 : 103-24.
24. Aridor M. Visiting the ER : the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2007 ; 59 : 759-81.
25. French PJ, van Doorninck JH, Peters RH, *et al.* A delta F508 mutation in mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator results in a temperature-sensitive processing defect *in vivo*. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 1304-12.
26. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 519-29.
27. Bernier V, Lagacé M, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones : potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2004 ; 15 : 222-8.
28. Fan JQ. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies : use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 2008 ; 389 : 1-11.
29. Hamanaka R, Shinohara T, Yano S, *et al.* Rescue of mutant alpha-galactosidase A in the endoplasmic reticulum by 1-deoxygalactonojirimycin leads to trafficking to lysosomes. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1782 : 408-13.
30. Pey AL, Ying M, Cremades N, *et al.* Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest* 2008; (sous presse ; doi :10.1172/JCI34355)
31. Tropak MB, Mahuran D. Lending a helping hand, screening chemical libraries for compounds that enhance beta-hexosaminidase; A activity in GM2 gangliosidosis cells. *FEBS Journal* 2007 ; 274 : 4951-61.
32. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008 ; 319 : 916-9.
33. Foufelle F, Ferré P. La réponse UPR : son rôle physiologique et physiopathologique. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 291-6.
34. Yon-Kahn J. Repliement des protéines : études *in vitro*. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 601-7.
35. Goldberg ME. Le repliement des protéines : seconde traduction du message génétique. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 563-6.
36. Kaplan JC, Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine*, 3e ed. Collection *De la biologie à la clinique*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007 : 820 p.

Nouvelles.indd 915 29/10/2008 14:34:12

Amiante et inflammation, rôle de l'inflammasome

Catherine Dostert, Virginie Pétrilli

Département de Biochimie, Université de Lausanne, Chemin des Boveresses 155, 1066 Epalinges, Suisse.
Catherine.Dostert@unil.ch

› L'amiante comprend un ensemble de substances minérales (silicate de calcium ou de magnésium) de texture fibreuse dont la principale caractéristique est de résister au feu, et de posséder des propriétés isolantes. L'exposition répétée aux fibres d'amiante entraîne communément une fibrose pulmonaire ou asbestose, ainsi que l'apparition de tumeurs spécifiques de la plèvre, du péritoine ou du péricarde, les mésothéliomes. Les mésothéliomes se développent après 30 à 40 ans d'exposition aux poussières d'amiante. L'amiante favorise également l'apparition de tumeurs broncho-pulmonaires, deux à cinq fois plus fréquentes que chez des personnes non exposées, après seulement 10 à 20 ans d'exposition [1].

Des complications similaires sont liées à la silicose, déclenchée par l'inhalation répétée des particules de silice. Dans les deux cas, asbestose et silicose, le développement de la maladie se traduit par une étape initiale d'inflammation.

Bien que de nombreuses études épidémiologiques aient démontré la relation causale entre l'amiante et l'apparition de fibroses pulmonaires et de mésothéliomes, les mécanismes biologiques aboutissant à l'inflammation pulmonaire après exposition à l'amiante ou au silice sont à ce jour très peu connus.

Le récepteur *NOD-like* Nalp3 des macrophages, un composant de l'inflammasome

Les macrophages pulmonaires jouent un rôle primordial dans l'élimination des pathogènes et des corps étrangers au niveau du poumon en ingérant ces composés pour ensuite les détruire. Le contact qui s'établit entre les macrophages et les corps étrangers active des récepteurs cellulaires de l'immunité innée et induit la sécrétion de médiateurs inflammatoires, dont une cytokine pro-inflammatoire essentielle l'interleukine-1β (IL-1β). Un certain nombre de récepteurs cellulaires capables de déclencher une réponse inflammatoire sont exprimés par les macrophages, parmi eux les *Toll-like receptors* (TLR) [11] et les *NOD-like receptors* (NLR) reconnaissent des signatures moléculaires de pathogènes (PAMP) ou des signaux de danger (DAMP, *damage associated molecular pattern molecules*) comme HMGB1 (*high mobility group box 1*), ou encore les protéines S100 ou l'ADN [2] *(Figure 1)*. Un de ces NLR, Nalp3, joue un rôle capital au niveau des macrophages dans la détection d'une variété de PAMP et de DAMP, en induisant notamment la production d'IL-1β [3].

Le récepteur Nalp3 agit au sein d'un complexe moléculaire appelé « l'inflammasome ». De façon schématique, ce

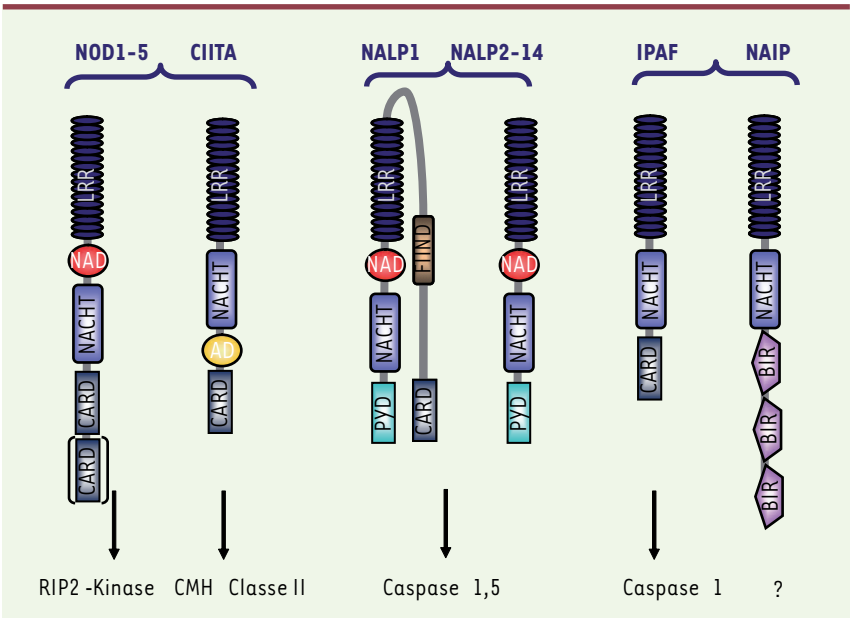


Figure 1. ***Récepteurs intracellulaires du système immunitaire inné.*** Les *Nod-like receptors* (NLR) font partie de la famille des récepteurs intracellulaires de l'immunité innée. La famille des NLR comprend 22 membres dont les NALP (*NACHT, LRR and PYD containing protein*), les NOD (*nucleotide oligomerisation domain*), IPAF (*ICE protease activating factor*), NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) et le facteur de transcription CIITA. Chaque sous-famille active des voies de signalisation différentes. LRR : *leucine-rich repeat* ; NAD : *NACHT associated domain* ; NACHT : *domain present in neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), the major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator* (CIITA), HET-E and TP1 ; PYD : *PYrin domain* ; CARD : *caspase recruitment domain* ; BIR : *baculovirus inhibitor of apoptosis (IAP) repeat*.

Nouvelles.indd 916 29/10/2008 14:34:12

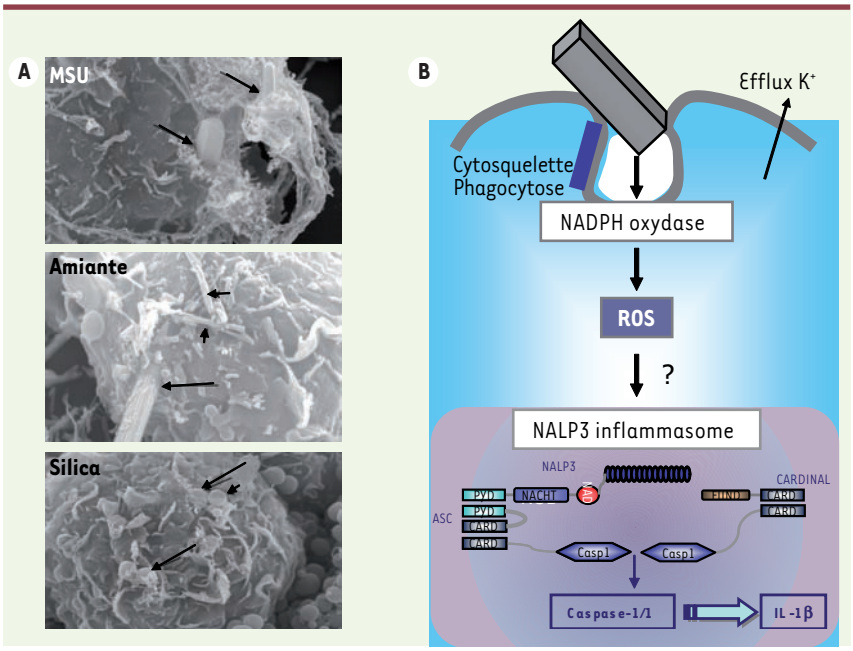


Figure 2. ***Activation de l'inflammasome Nalp3 par l'amiante. A.*** Macrophages humains exposés à des particules de MSU, d'amiante ou de silice. Les flèches indiquent les particules entrant dans la cellule. ***B.*** L'amiante est phagocytée par les macrophages, induisant l'activation de la NADPH oxydase et la production de dérivés réactifs d'oxygène (ROS). Ces événements activent l'inflammasome Nalp3, ce qui résulte dans la production d'interleukine-1β (IL-1β) pro-inflammatoire.

complexe est formé par différentes protéines, le récepteur Nalp3, les adaptateurs, ASC et Cardinal, et la caspase-1, enzyme responsable de la maturation du précurseur proIL-1β en IL-1β active [4]. Des mutations de Nalp3 sont associées à trois maladies auto-inflammatoires de transmission autosomique dominante – le syndrome de Muckle Wells[1], le *familial cold auto-inflammatory syndrome* (FCAS) et le syndrome *chronic infantile neurological cutaneous and articular* (CINCA) – qui se caractérisent par des périodes récurrentes de fièvre sans infection associée, accompagnées d'une sécrétion d'IL-1β élevée [5].

La « phagocytose frustrée » des fibres d'amiante

Nalp3 est capable de détecter différents signaux associés à des pathogènes, mais également des signaux de danger, comme l'ATP ou les cristaux d'urate monosodique (MSU), qui sont à l'origine d'une maladie inflammatoire fréquente, la goutte [6]. L'amiante étant également une structure cristalline, nous avons voulu analyser ses capacités à activer l'inflammasome. Après exposition aux fibres d'amiante, les macrophages humains et murins produisent de fortes quantités d'IL-1β et ceci sous le contrôle de l'inflammasome Nalp3 [7]. De façon similaire aux cristaux de MSU, les fibres d'amiante déclenchent un efflux de potassium de la cellule, nécessaire à l'activation de Nalp3 par un mécanisme qui reste cependant encore inconnu *(Figure 2)*. Les cristaux d'urate, de même que les fibres d'amiante, vont être phagocytés par les macrophages, ou du moins, les macrophages vont essayer de phagocyter ces particules sans toutefois parvenir à les ingérer complètement ni à les éliminer, un phénomène connu sous le nom de « phagocytose frustrée ». La déstabilisation du cytosquelette d'actine (responsable de la phagocytose) par la cytochalasine D empêche l'activation de l'inflammasome par l'amiante et la production d'IL-1β, démontrant le rôle essentiel de la phagocytose dans l'activation de l'inflammasome Nalp3. L'amiante est également capable d'induire la production des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule et le traitement des cellules avec des antioxydants empêche la production d'IL-1β en réponse aux activateurs de l'inflammasome. La source de ces dérivés réactifs de l'oxygène durant la phagocytose pourrait être l'activation d'un complexe membranaire appelé NADPH oxydase, une enzyme activée par la phagocytose des bactéries [12]. L'inhibition pharmacologique de la NADPH oxydase (par le diphénylène iodonium) et son inactivation par réduction de l'expression de la sous-unité p22phox par ARN interférence, diminuent fortement la production d'IL-1β mature en réponse à l'amiante. Enfin, la réduction de l'expression d'une protéine cellulaire impliquée dans la détoxification des dérivés réactifs de l'oxygène, la thiorédoxine, aboutit, à l'inverse, à une production accrue d'IL-1β en réponse à l'amiante et à la silice.

Modèle *in vivo* d'exposition à l'amiante

Afin d'étudier les conséquences sur l'asbestose de l'inactivation de Nalp3 *in vivo*, nous avons utilisé un modèle murin d'inhalation de fibres d'amiante. L'exposition à l'amiante de souris de génotype sauvage induit un recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons, indiquant une réaction inflammatoire. En revanche, dans les poumons des souris déficientes en Nalp3, ce recrutement de cellules inflammatoires est fortement réduit, de même que la production d'un certain nombre de cytokines, soulignant l'importance de l'inflammasome Nalp3 dans cette pathologie.

Inhiber l'IL-1, une perspective thérapeutique ?

L'ensemble de ces résultats démontrent que la phase inflammatoire induite par

[1] À ces signes s'associe une surdité neurosensorielle qui s'installe dans l'adolescence. La gravité de l'affection réside dans la survenue inconstante d'une amylose généralisée de type AA (source, orphanet).

Nouvelles.indd 917 29/10/2008 14:34:12

l'inhalation de fibres d'amiante est relayée par l'inflammasome Nalp3 et dépendante de la production d'IL-1β. Des travaux similaires ont démontré le rôle capital de l'inflammasome dans le développement de la silicose [8]. L'usage d'un inhibiteur naturel de l'IL-1, antagonisant le récepteur de l'IL-1, l'Anakinra, pourrait se révéler extrêmement efficace dans le cadre du traitement de l'asbestose et de la silicose. Cet inhibiteur est déjà utilisé efficacement dans le traitement d'autres maladies associées à Nalp3, comme la goutte [9] et les maladies auto-inflammatoires tel le syndrome de Muckle-Wells [10]. Nalp3 s'avère être une cible intéressante pour le développement de nouveaux médicaments visant à traiter les pathologies inflammatoires. ◊

Asbestos triggers inflammation by activating the Nalp3 inflammasome

RÉFÉRENCES

1. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : 1666-80.
2. Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 1250-7.
3. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome : a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007 ; 19 : 615-22.
4. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome : a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002 ; 10: 417-26.
5. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases : genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 2005 ; 17 : 586-99.
6. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, *et al*. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006 ; 440 : 237-41.
7. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, *et al*. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008 ; 320 : 674-7.
8. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, *et al*. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 9035-40.
9. So A, De Smedt T, Revaz S, Tschopp J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther* 2007 ; 9 : R28.
10. Hawkins PN, Lachmann HJ, McDermott MF. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 2583-4.
11. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. Immunité naturelle : structure et fonction des Toll-like receptors. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 67-73.
12. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, *et al*. Les Nox/Duox : une nouvelle famille de NADPH oxydases. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 953-9.

NOUVELLE

Le génome de l'ornithorynque
À la croisée des chemins

Simone Gilgenkrantz

Médecine/Sciences, 9, rue Basse, 54330 Clérey-sur-Brénon, France.
simone.gilgenkrantz@club-internet.fr

› L'ornithorynque (*Ornithonryncus anaticus*) qui – comme son nom l'indique – a pour nez un bec de canard, est un animal si improbable qu'à la fin du XVIII^e^ siècle, les zoologistes anglais hésitèrent à croire à son existence [1]. En effet, admettre qu'un mammifère à fourrure de castor puisse avoir un bec et des pattes de canard, qu'il ponde des œufs, mais qu'une fois éclos, la femelle les allaite et que le mâle adulte soit venimeux grâce à un ergot situé sur les pattes postérieures nécessitait une certaine crédulité. Mais les observations faites en Australie confirmèrent qu'il s'agissait bien d'un monotrème (pourvu d'un cloaque comme les oiseaux et les reptiles) et qu'il était le seul survivant de la famille des *Ornithorynchidae,* pourtant jadis importante si l'on en juge par les espèces fossiles retrouvées.

Biologie des monotrèmes

Animal semi-aquatique, nocturne et très craintif, il vit dans les cours d'eau des régions froides d'Australie et de Tasmanie. Il peut rester des heures entières à des températures basses (autour de 5 °C) car bien qu'il soit homéotherme, sa fourrure doublée de tissu adipeux lui permet de

maintenir sa température à 31 °C. On le trouve aussi dans la réserve d'Healesville (État du Victoria) où il est plus facile de l'observer, mais il se reproduit mal en captivité. Situés à l'embranchement entre mammifères et reptiles, l'ornithorynque et les échinidés (à l'aspect de gros hérissons, dont il ne reste plus que quelques espèces) forment le petit groupe des monotrèmes. Ceux-ci se sont séparés des thériens (marsupiaux et euthériens) il y a environ 166 millions d'années *(Figure 1)*. Ainsi, bien qu'il soit un mammifère, cet animal possède des caractères reptiliens ancestraux tels que l'oviparité et l'aspect des spermatozoïdes.

La femelle pond un à trois œufs par an. Plus sphériques que les œufs d'oiseaux, ils sont incubés pendant une dizaine de jours. Il est possible que, dans l'évolution, la sécrétion lactée ait précédé l'apparition des mammifères et qu'elle ait exercé sur les œufs parcheminés des synapsides pendant l'incubation un rôle protecteur, empêchant la dessiccation et

Nouvelles.indd 918 29/10/2008 14:34:30

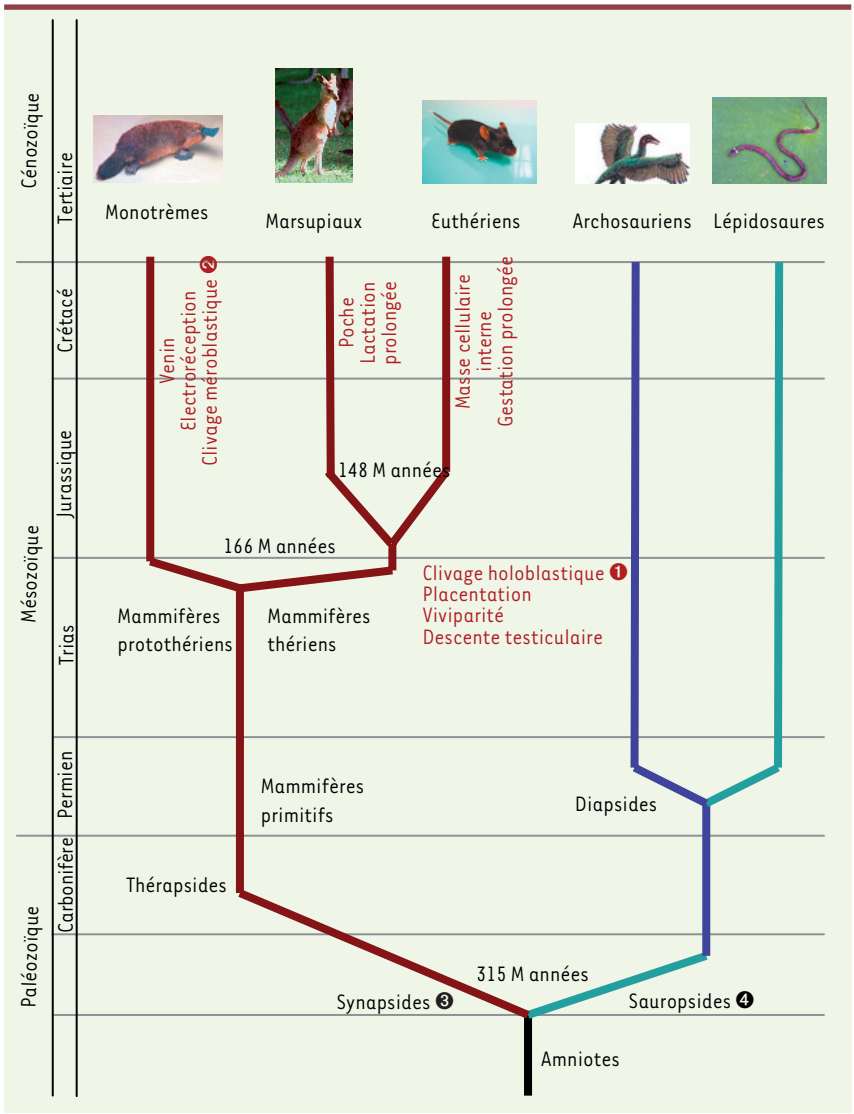


Figure 1. ***Évolution des espèces avec émergence des caractères des mammifères*** (d'après [3]). Le clivage holoblastique est complet **(1)** tandis que dans le clivage méroblastique **(2)**, le vitellus, le noyau et le cytoplasme actif sont repoussés au pôle animal, seul affecté par la segmentation. Ce type de processus de division cellulaire incomplète du zygote s'observe chez les oiseaux, les reptiles et plusieurs poissons, dont les œufs accumulent une grande quantité de vitellus. **(3)** Les synapsides sont les animaux dont le crâne possède une seule fosse temporale en position inférieure. C'est le cas des reptiles mammaliens qui vécurent du Carbonifère au Trias et des mammifères. **(4)** Les sauropsides, qui comprenaient les dinosaures, sont représentés aujourd'hui par les tortues, les lézards, les serpents, les crocodiles et les oiseaux.

les infections microbiennes [2]. Une fois éclos, les petits, aveugles et dépourvus de poils, recueillent le lait (très riche en sucres, lipides et protéines) qui s'écoule à travers des pores de la peau car il n'y a pas de mamelons. Bien qu'il existe chez les jeunes des molaires, celles-ci disparaissent à l'âge adulte.

Les spermatozoïdes, ainsi que la spermiogenèse ont été bien étudiés [3]. Cette dernière se fait en 16 étapes et ressemble à celle des reptiles. Les spermatozoïdes ont une maturation post testiculaire, avec acquisition d'une mobilité progressive pendant le passage à travers l'épididyme. Ils sont filiformes et spiralés ; l'acrosome est réduit ainsi que la pièce intermédiaire avec quelques rares fibres supportant la pièce principale.

L'ornithorynque est doté, comme les autres monotrèmes, mais d'une façon plus développée, du sens de l'électrolocalisation grâce à des récepteurs situés dans la partie caudale de la peau du bec. Il peut ainsi détecter le champ électrique produit par les proies environnantes. Carnivore, il se nourrit de larves d'insectes et de crevettes d'eau douce qu'il stocke dans ses bajoues avant de les déguster sur le rivage. D'autres types de récepteurs qui semblent uniformément répartis devront être étudiés à la lumière des nouvelles données fournies par l'étude du génome.

Le génome de l'ornithorynque

La situation intermédiaire de ce mammifère dans l'évolution justifiait pleinement le séquençage et l'analyse comparative de son génome. C'est chose faite. Une centaine de chercheurs de nombreux pays (dont l'UMR INRA-CNRS 6073 de Touraine) viennent de rechercher, en fonction de leur spécialité, ce que les monotrèmes possèdent en propre et surtout ce qu'ils ont en commun avec les reptiles et les mammifères [4].

En 2004, une équipe australienne avait analysé les chromosomes sexuels : ils sont au nombre de 10, tous identiques chez la femelle et en alternance, un petit et un grand chez le mâle [5]. Le plus grand chromosome ressemble plutôt au chromosome Z des oiseaux et possède le gène *DMRT1* (*doublesex- and mab3-related transcription factor 1*) impliqué dans les réversions sexuelles chez l'homme [6]. Mais sur son chromosome 6, l'ornithorynque est doté d'une région très conservée de l'X (y compris SOX3, ancêtre de SRY). Celle-ci reflète donc une séquence importante du chromosome ancestral d'où sont issus les chromosomes sexuels des thériens.

Des trois gènes de la vitellogénine (jaune d'œuf dont les petits se nourrissent jusqu'à l'éclosion chez les oiseaux), il

Nouvelles.indd 919 29/10/2008 14:34:32

n'en reste plus qu'un seul. En revanche, l'ornithorynque possède tous les gènes codant la caséine, protéine importante du lait des mammifères. Ainsi, selon une étude suisse, la lactation serait à l'origine de la perte progressive de la vitellogénine et elle aurait précédé la placentation [7].

Les gènes codant les protéines de l'émail sont conservés, ce qui explique la présence de dents chez les jeunes. Concernant les gènes de la vision, alors que les mammifères sont pour la plupart dichromates (avec *LWS* et *SWS1*, *long and short wave sensitive classes*), les monotrèmes ont conservé SWS2, tandis que les primates, ultérieurement, ont acquis une vision trichrome grâce à la duplication du gène *LWS* [8].

Quant au venin, qui provoque des douleurs très vives et prolongées (dues sans doute à la production d'un courant calcium-dépendant [9]), il est composé d'un cocktail d'au moins 19 substances, comprenant des peptides proches des défensines (substances antimicrobiennes) ou OvDLP (*ornithorynchus venom defensin-like*) ; des peptides analogues (comme les crotamines) sont aussi observés dans les venins de serpents.

Bien que le système immunitaire des monotrèmes soit semblable à celui des autres mammifères, les chercheurs ont eu la surprise de trouver 214 gènes de NKR (*natural killer receptor*), nombre bien plus élevé que chez l'homme (15 gènes) ou le rat (45 gènes). Comme l'opossum, l'ornithorynque possède une expansion de la famille des gènes codant des cathélicidines. L'homme et les rongeurs n'en possèdent qu'un (*CAMP* pour *cathelicidin antimicrobial peptide*). Il est possible que chez les mammifères, l'augmentation du temps de la gestation et du développement *in utero* rendent moins utiles ces peptides antimicrobiens que pour les jeunes de monotrèmes qui ont besoin d'un arsenal étendu de réponses immunes innées.

Mais, la plus grande surprise de cette étude génomique vient certainement de la découverte des très nombreux gènes codant des récepteurs, olfactifs et de type voméronasal V1R et V2R. Il semble que ceux-ci, répartis sur le bec, reflètent une adaptation sensorielle pour des composés odorants solubles dans l'eau dans laquelle l'ornithorynque passe le plus clair de son temps. Le grand répertoire (environ 700) des gènes – et pseudogènes – des récepteurs odorants rapproche l'ornithorynque des mammifères plutôt que des sauropsidés qui en possèdent beaucoup moins.

Cette étude, dont nous ne mentionnons ici que les points principaux, et dont nous ne saurions trop recommander la lecture, apporte des notions extrêmement intéressantes sur le processus de l'évolution entre oiseaux et mammifères et confère à l'ornithorynque un génome unique parmi les êtres vivants. ◊

Genome of the platypus : at the crossroads

RÉFÉRENCES

1. Hall BK. The paradoxical platypus. *BioScience* 1999 ; 49 : 211-8.
2. Oftedal OT. The origin of lactation as a water source for parchment-shelled eggs. *Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002 ; 7 : 253-66.
3. Lin M, Jones RC. Spermiogenesis and spermiation in a monotreme mammal, the platypus, *Ornitoryncus anatinus*. *J Anat* 2000 ; 196 : 217-32.
4. International Platypus Genome Sequencing Consortium. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature* 2008 ; 453 : 175-83.
5. Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, *et al.* In the platypus a meioic chain of ten sex chomosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 2004 ; 432 ; 913-7.
6. Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, *et al.* Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res* 2008 : 18 : 965-73.
7. Brawand D, Wahli W, Kaessmann H. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *Plos Biol* 2008 ; 6 : e63.
8. Davies WL, Carvalho LS, Cowing JA, *et al.* Visual pigments of the platypus : a novel route to mammalian colour vision. *Curr Biol* 2007 ; 17 : R161-3.
9. De Plater GM, Milburn PJ, Martin RL. Venom from platypus, *Ornithorynchus anatinus*, induces a calcium-dependent current in cultured dorsal root ganglion cells. *J Neurophysiol* 2001 ; 85 : 1340-5.

Nouvelles.indd 920 29/10/2008 14:34:32

Hippocampe, striatum et séquences

Geneviève Albouy, Pierre Maquet

G. Albouy : Centre de Recherches du Cyclotron, Université de Liège, B30, Sart Tilman, B-4000 Liège, Belgique. Université de Lyon ; Lyon, France. CNRS UMR 5167 ; Lyon, France. Inserm U821 ; Lyon, France. albouy@sommeil.univ-lyon1.fr
P. Maquet : Centre de Recherches du Cyclotron ; Université de Liège ; Liège, Belgique. Departement de Neurologie, CHU Sart Tilman ; Liège, Belgique.

Les différents systèmes de mémoire

La mémoire chez l'homme est communément classifiée en deux systèmes : la mémoire déclarative (mémoire des faits, des événements) et la mémoire procédurale (habiletés perceptives ou motrices) [1]. Ces systèmes de mémoire dépendraient de réseaux neuronaux anatomiquement et fonctionnellement dissociables impliquant respectivement des structures temporales médiales (dont l'hippocampe) et des circuits striato-cérébello-corticaux [10]. Cependant, ces deux systèmes de mémoire peuvent interagir [2]. En effet, l'hippocampe, région déjà largement décrite pour son rôle primordial dans la consolidation des mémoires déclaratives, est aussi connu pour être recruté lors d'apprentissages procéduraux de séquences motrices [3].

La mémoire procédurale : apprentissage de séquences

La mémoire procédurale constitue l'un des principaux systèmes de mémoire chez l'homme. Ce type d'apprentissage mène, par exemple, à l'acquisition graduelle d'une habileté nouvelle à exécuter un mouvement complexe (apprentissage moteur). L'apprentissage de séquences motrices constitue l'un des paradigmes d'apprentissage procédural les plus étudiés. Les séquences motrices font partie intégrante d'un grand nombre d'activités de la vie quotidienne comme écrire, parler, tricoter, conduire une voiture ou jouer d'un instrument de musique. Lors de l'apprentissage de séquences motrices, il est couramment observé que les performances s'améliorent significativement au cours de la première session d'entraînement, au fur et à mesure de la pratique. De manière très intéressante, l'amélioration des performances se poursuit même lorsque l'entraînement est terminé et se manifeste par un gain de performance lors d'un retest ultérieur [4]. Ces observations suggèrent que la mémoire des séquences motrices bénéficie d'un processus de consolidation en l'absence de pratique supplémentaire. Il est maintenant clairement admis que le sommeil joue un rôle bénéfique dans ces phénomènes de consolidation [5, 6].

Les corrélats cérébraux de ces types d'apprentissage ont déjà été largement décrits et font intervenir le cervelet, les ganglions de la base et le cortex moteur [7]. Il a récemment été montré que l'hippocampe était impliqué dans l'apprentissage de séquences motrices du fait de sa capacité à associer des informations structurées mais temporellement discontiguës [3]. À l'inverse, les corrélats cérébraux de la consolidation mnésique de séquences motrices restent encore mal connus. Il semblerait que les phases précoces de l'apprentissage soient prises en charge par des réseaux cérébello-corticaux tandis que la rétention à long terme des mémoires de séquences motrices utiliserait des réseaux striato-corticaux [7].

Hippocampe, striatum et séquences

Le but de notre étude [8] consistait à élucider les corrélats cérébraux de la consolidation d'un apprentissage implicite de séquences oculomotrices. Nous avons donc enregistré de jeunes sujets volontaires sains en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) lors d'un apprentissage de séquences oculomotrices [9]. Les participants ont été retestés 30 minutes, 5 heures ou 24 heures (incluant une période de sommeil nocturne) après l'entraînement initial *(Figure 1A)*. Les corrélats cérébraux de la consolidation de la trace mnésique ont été caractérisés de

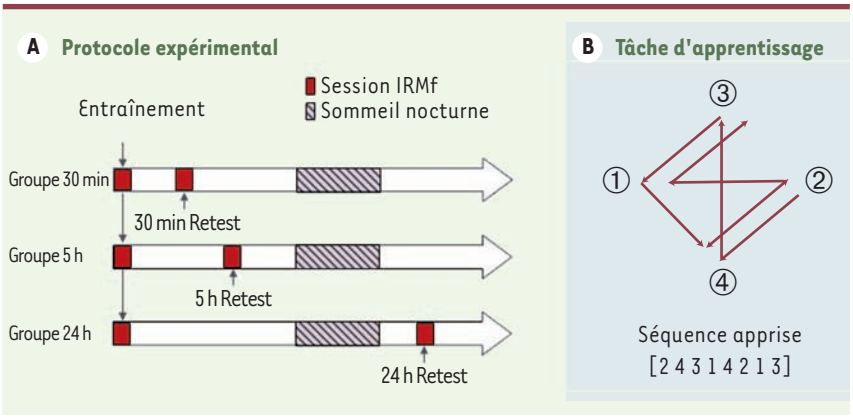


Figure 1. ***Protocole expérimental et tâche d'apprentissage. A.*** Tous les volontaires ont été entraînés à la tâche dans le scanner. Ils ont alors été repartis en 3 groupes expérimentaux, selon la date du retest ultérieur dans le scanner (30 minutes, 5 heures ou 24 heures après la fin de l'entraînement). ***B.*** La trajectoire du point dans la tâche d'apprentissage suit toujours la même séquence de déplacement qui est apprise de manière implicite par les participants.

Nouvelles.indd 921 29/10/2008 14:34:32

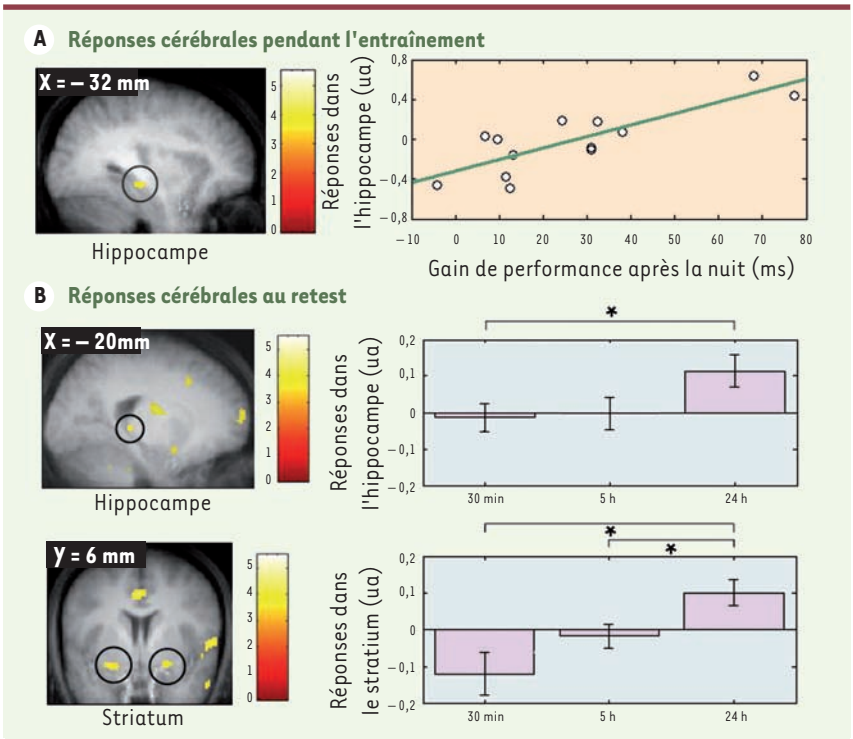


Figure 2. ***Résultats de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle. A.*** Les réponses cérébrales dans l'hippocampe pendant l'entraînement sont linéairement reliées aux gains de performance observés après la nuit de sommeil. ***B.*** Les réponses cérébrales dans l'hippocampe et le striatum sont plus importantes lors du retest à 24 heures que lors de celui effectué à 30 minutes ou à 5 heures après l'entraînement. ua : unités arbitraires.

manière indirecte par la modification des réponses cérébrales observées lors du retest. Pendant la tâche d'apprentissage, les participants avaient l'instruction de suivre des yeux un point qui se déplaçait à l'écran dans le but de détecter un bref changement de sa couleur. Cependant, à l'insu des sujets, le mouvement du point suivait toujours la même séquence de déplacement (séquence apprise) tout au long du test *(Figure 1B)*. Nos résultats montrent que la performance des sujets (temps de réaction oculaire pour atteindre le point) s'améliore au cours de la pratique de la tâche indiquant que les volontaires ont appris inconsciemment la séquence de déplacement du point [9]. Une amélioration des performances est observée au cours de la journée (retests à 30 minutes et à 5 heures) mais, de manière intéressante, cette amélioration devient spécifique de la séquence apprise seulement après une nuit de sommeil (retest à 24 heures).

Au niveau cérébral, comme attendu, les réponses caractérisant l'apprentissage sont observées à la fois dans l'hippocampe et le striatum. Cependant, la principale découverte de cette expérience réside en l'observation que ces réponses sont proportionnelles aux gains de performance observés après la nuit (24 heures après l'apprentissage, *Figure 2A*) mais pas au cours de la journée (30 minutes ou 5 heures après l'apprentissage). Le recrutement précoce de l'hippocampe et du striatum lors de l'apprentissage de séquences motrices prédit donc le gain de performance observé après la nuit. L'activation de ces régions lors de l'apprentissage semble donc profondément influencer la consolidation nocturne des mémoires motrices. En effet, c'est seulement après la nuit que les réponses dans l'hippocampe et le striatum sont plus importantes comparées aux retests ayant eu lieu pendant la journée *(Figure 2B)*. Finalement, les interactions fonctionnelles entre ces deux structures primordiales pour l'apprentissage semblent se modifier au cours des phénomènes de consolidation. En effet, l'interaction compétitive observée pendant l'entraînement entre l'hippocampe et le striatum semble devenir coopérative après la nuit, permettant d'optimiser le comportement moteur.

Conclusions

Nos résultats montrent que l'hippocampe, région du lobe médio-temporal jusqu'ici décrit surtout dans la consolidation de la seule mémoire déclarative, joue un rôle primordial dans la consolidation des mémoires procédurales. Les réponses dans l'hippocampe et le striatum conditionnent les phénomènes de consolidation observés après la nuit qui sont associés à des changements d'interaction fonctionnelle entre ces aires cérébrales permettant d'optimiser les mouvements séquentiels moteurs. ◊

Hippocampus, striatum and sequences

RÉFÉRENCES

1. Cohen NJ, Squire LR. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia : dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 1980 ; 210 : 207-10.
2. Poldrack RA, Clark J, Pare-Blagoev EJ, *et al.* Interactive memory systems in the human brain. *Nature* 2001 ; 414 : 546-50.
3. Schendan HE, Searl MM, Melrose RJ, Stern CE. An FMRI study of the role of the medial temporal lobe in implicit and explicit sequence learning. *Neuron* 2003 ; 37 : 1013-25.
4. Karni A, Meyer G, Jezzard P, *et al.* Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature* 1995 ; 377 : 155-8.
5. Maquet P, Laureys S, Peigneux P, *et al.* Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat Neurosci* 2000 ; 3 : 831-6.
6. Peigneux P, Laureys S, Fuchs S, *et al.* Learned material content and acquisition level modulate cerebral reactivation during posttraining rapid-eye-movements sleep. *Neuroimage* 2003 ; 20 : 125-34.
7. Doyon J, Penhune V, Ungerleider LG. Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 2003 ; 41 : 252-62.
8. Albouy, G, Sterpenich V, Balteau E, *et al.* Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory. *Neuron* 2008 ; 58 : 261-72.
9. Albouy G, Ruby P, Phillips C, *et al.* Implicit oculomotor sequence learning in humans : time course of offline processing. *Brain Res* 2006 ; 1090 : 163-71.
10. Vigot R. La dépression synaptique à long terme : un mécanisme pour la mémoire et l'apprentissage au niveau du cervelet. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 437-41.

Nouvelles.indd 922 29/10/2008 14:34:39

CALHM1, nouvel acteur du processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer

Jean-Charles Lambert, Fabien Campagne, Philippe Marambaud

J.C. Lambert : Inserm, U744, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille II, 59000 Lille, France.
jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr
F. Campagne : 2HRH Prince Alwaleed Bin Talal Bin Abdulaziz Alsaud Institute for Computational Biomedicine and Department of Physiology and Biophysics, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, États-Unis.
fac2003@med.cornell.edu
P. Marambaud : Litwin-Zucker Research Center for the Study of Alzheimer Disease, The Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, NY, États-Unis.
pmaramba@aecom.yu.edu

> La maladie d'Alzheimer est un syndrome multifactoriel [1] caractérisé au niveau histologique par la présence immuable de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques séniles. L'étude génétique des formes familiales monogéniques a permis une meilleure compréhension de l'étiologie de la maladie, et ceci à travers l'identification de mutations dans des gènes impliqués dans les voies moléculaires associées à la formation des plaques séniles. Ces plaques sont formées à partir de l'agrégation d'un peptide de 40 à 42 résidus, appelé le peptide amyloïde ou Aβ. Ce peptide est issu de l'endoprotéolyse d'un précurseur protéique appelé APP (*amyloid precursor protein*), par l'action des enzymes β-sécrétase et γ-sécrétase. Des mutations dans les composants catalytiques de la γ-sécrétase – les présénilines 1 et 2 – et dans l'APP, ont été identifiées comme responsables de l'apparition de l'essentiel des formes monogéniques de la maladie [2, 3]. Toutes ont pour conséquence de modifier le métabolisme de l'APP en faveur de la production des peptides Aβ et ces observations représentent encore les fondements de l'hypothèse de la cascade amyloïde [4]. Comme toute théorie, cette hypothèse a été contestée. Une des critiques principales s'attarde sur le fait que ces formes familiales dues à des mutations des présénilines et de l'APP représentent moins de 1 % des cas et dès lors, ne seraient pas représentatives de l'ensemble des formes sporadiques de la maladie. D'autres hypothèses ont alors été proposées dont certaines suggérant que l'étiologie de la maladie d'Alzheimer trouve également sa source dans une dérégulation des voies de signalisation par le calcium intracellulaire [5]. Cette hypothèse a suscité beaucoup d'intérêt car la signalisation calcique est un événement déterminant dans la mise en place des mécanismes transcriptionnels associés à la formation et à la persistance de la mémoire [6].

Recherche de gènes candidats pour la maladie d'Alzheimer

Le seul facteur de risque reconnu à ce jour pour les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer est la présence de l'allèle e4 du gène de l'APOE (apolipoprotéine E). Une dizaine de régions chromosomiques ont été identifiées comme contenant un ou plusieurs gènes de susceptibilité à des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer. Plusieurs centaines de gènes dans ces régions ont été proposés comme facteurs de susceptibilité mais sans succès [2].

Nous avons alors postulé que des gènes localisés dans des régions chromosomiques d'intérêt et exprimés dans des régions cérébrales particulièrement affectées par les processus neurodégénératifs, étaient des gènes candidats pour la maladie d'Alzheimer. En effet, un certain nombre de désordres dus à une dégénérescence neuronale résultent de mutations dans des gènes principalement exprimés dans le système nerveux central, comme cela a pu être décrit pour la maladie de Parkinson ou les démences fronto-temporales [7, 8].

Dans la maladie d'Alzheimer, la première atrophie cérébrale observée se produit dans le lobe temporal médian, qui inclut l'hippocampe. Étant donné le rôle prépondérant de l'hippocampe dans la consolidation de la mémoire, nous avons choisi de sélectionner des gènes candidats exprimés dans l'hippocampe humain. Pour ce faire, nous avons utilisé les informations disponibles dans les bases de données dbEST et TissueInfo [9]. Nous avons ainsi identifié une liste de plusieurs gènes exprimés faiblement dans l'hippocampe.

Parmi les douze gènes identifiés, deux d'entre eux se sont avéré être localisés dans des régions chromosomiques associées aux formes tardives de la maladie d'Alzheimer. Nous avons décidé de concentrer nos efforts sur un gène de fonction alors inconnue. Ce gène appelé *FAM26C* est localisé sur le chromosome 10 *(Figure 1)*, l'une des régions chromosomique d'intérêt les mieux caractérisées [10].

CALHM1, un nouveau canal calcique impliqué dans le métabolisme de l'APP

Nous avons déterminé que FAM26C code pour une glycoprotéine transmembranaire principalement exprimée dans le cerveau adulte, et impliquée dans la régulation des concentrations intracellulaires de calcium. Nous avons donc appelé cette protéine CALHM1 pour *calcium homeostasis modulator 1*.

Cette protéine présente, au sein de sa séquence peptidique, un motif similaire au filtre de sélectivité ionique du récepteur au NMDA. Un résidu asparagine localisé dans ce motif est d'ailleurs essentiel au contrôle des concentrations calciques par CALHM1. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont indiqué que CALHM1 est capable de former des structures tétramériques, une propriété partagée par beaucoup de canaux ioniques pour former un pore fonctionnel.

Nouvelles.indd 923 29/10/2008 14:34:54

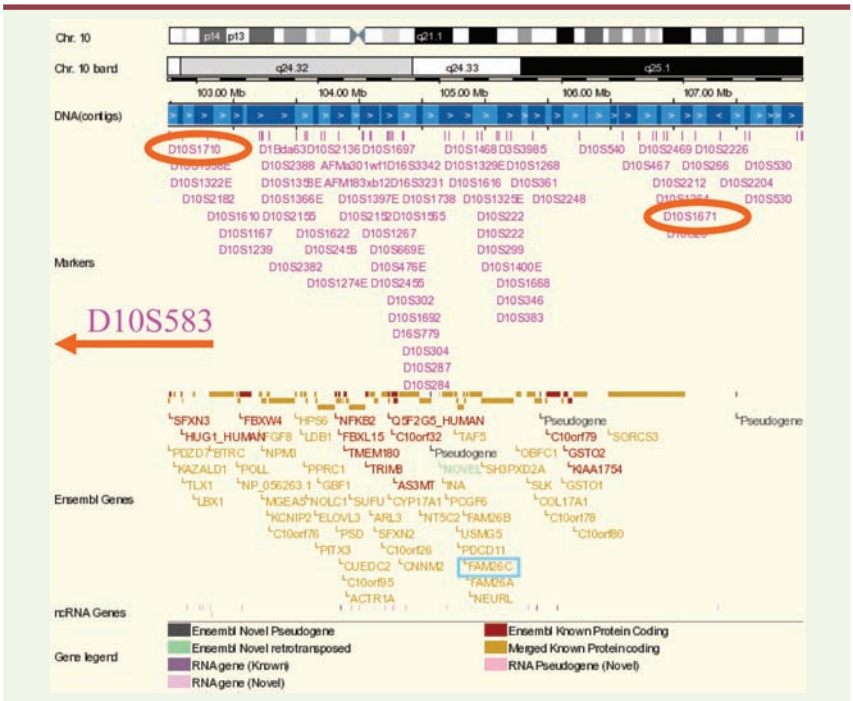


Figure 1. ***Région chromosomique située entre les marqueurs D10S1710 et D10S566.*** Cette région précédemment identifiée [10] contient un nombre important de gènes. L'approche bioinformatique utilisée a permis de réduire considérablement l'effort de génotypage des gènes candidats.

Enfin, le rôle potentiel de CALHM1 dans la perméabilité aux ions calcium a été directement étudié par des approches d'électrophysiologie. Ces approches ont démontré que l'expression de CALHM1 génère, à la surface cellulaire, un courant cationique sélectif aux ions calcium.

Nous avons enfin montré que CALHM1 était directement impliquée dans le métabolisme de l'APP. Nous avons déterminé par des études de gain de fonction (par transfection transitoire) ou de perte de fonction (par interférence ARN) appliquées à des modèles cellulaires, que CALHM1 est un répresseur important de la production des peptides Aβ *(Figure 2)*.

CALHM1, un nouveau déterminant génétique de la Maladie d'Alzheimer

Finalement, après séquençage du gène *CALHM1*, nous avons pu détecter un polymorphisme non synonyme au codon 86 correspondant au changement d'une proline (allèle P) en leucine (allèle L). Nous avons pu alors montrer, en étudiant 2 043 patients atteints de maladie d'Alzheimer et 1 361 individus indemnes de démences, que l'allèle L était associé à une augmentation de l'ordre de 44 % du risque de développer la pathologie. De façon remarquable, cet allèle L provoque une perte significative du contrôle de CALHM1 sur l'homéostasie du calcium avec pour conséquence une augmentation de la production des peptides Aβ.

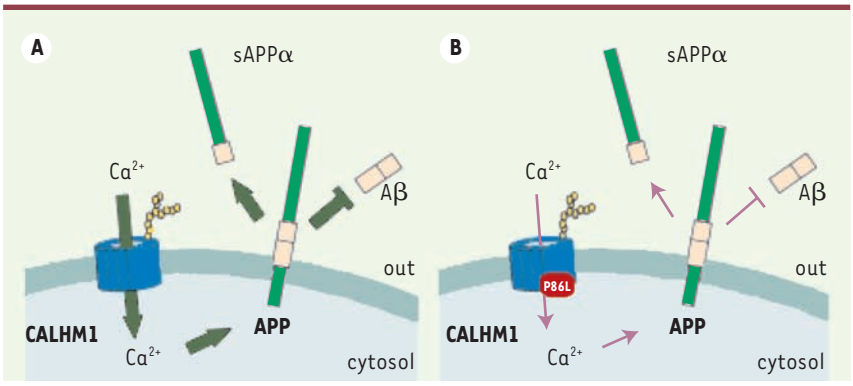


Figure 2. ***Le polymorphisme P86L de CALHM1 réduit sa perméabilité au calcium et son contrôle du métabolisme de l'APP. A.*** CALHM1 sauvage. ***B.*** CALHM1 mutée à la position 86.

Conclusion

À travers une étude multidisciplinaire et multi-institutionnelle, nous avons mis en évidence une nouvelle famille de canaux ioniques cérébraux dont certains variants pourraient constituer des facteurs de susceptibilité génétique de la maladie d'Alzheimer [11]. ◊

CALHM1, a novel gene to blame in Alzheimer disease

RÉFÉRENCES

1. Helmer C, Pasquier F, Dartigues JF. Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 288-96.
2. Lambert JC, Amouyel P. Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease : complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* 2007 ; 32 : S62-70.
3. Campion D, Hannequin D. La duplication du gène APP, cause de maladie d'Alzheimer associée à une importante angiopathie amyloïde. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 468-9.
4. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002 ; *297* : 353-6.
5. LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2002 ; 3 : 862-72.
6. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2004 ; 5 : 173-83.
7. Goedert M, Spillantini MG. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1502 : 110-21.
8. Lee VM., Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein : new targets for drug discovery. *Neuron* 2006 ; 52 : 33-8.
9. Skrabanek L, Campagne F. TissueInfo : high-throughput identification of tissue expression profiles and specificity. *Nucleic Acids Res* 2001 ; 29 : E101-2.0
10. Myers A, Holmans P, Marshall H, *et al.* Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 2000 ; 290 : 2304-5.
11. Dreses-Werringloer U, Lambert JC, Vingtdeux V, *et al.* A polymorphism in CALHM1 influences Ca^{2+} homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell* 2008 ; 133 : 1149-61.

Nouvelles.indd 924 29/10/2008 14:34:54

Différenciation des lymphocytes th17
Des souris et des hommes

Vassili Soumelis, Elisabetta Volpe

Institut Curie et Inserm U653,
Département d'Immunologie,
26, rue d'Ulm,
75005 Paris, France.
Vassili.soumelis@curie.net

> C'est à la fin des années 1980 qu'il a été montré que les lymphocytes T CD4 auxiliaires ou *helper* (TH) étaient hétérogènes quant à leur capacité à produire des cytokines effectrices. Des clones nommés TH1 (*T helper 1*) produisaient préférentiellement de l'Interféron (IFN)-γ et d'autres clones nommés TH2 produisaient de l'Interleukine (IL)-4. Ce paradigme s'est confirmé dans des modèles *in vitro* utilisant des lymphocytes T naïfs primaires ainsi qu'*in vivo* aussi bien chez l'homme que chez la souris. Cette hétérogénéité des profils cytokiniques est associée à une dichotomie fonctionnelle. Les lymphocytes TH1 sont particulièrement importants pour produire des réponses cytotoxiques dans le cadre d'infections à germes intracellulaires, tels que *Toxoplasma gondii, Leishmania major, Listeria monocytogenes* ou *Mycobacterium tuberculosis*, alors que les lymphocytes TH2 induisent préférentiellement une réponse humorale importante dans les infections à germes extracellulaires, comme les helminthes [1]. Lorsque ces réponses T sont exagérées ou non contrôlées, elles peuvent être associées à certaines pathologies, notamment les maladies auto-immunes pour les réponses TH1 et les maladies allergiques pour les réponses TH2 [1]. Bien que l'IFN-γ et l'IL-4 caractérisent toujours aujourd'hui la signature d'un profil TH1 et TH2, respectivement, un nombre croissant de cytokines potentiellement produites par les lymphocytes T a été identifié au cours des dernières années et a accru la complexité des profils cytokiniques T CD4. Le TNF-α et l'IL-10, par exemple, peuvent être produites aussi bien lors de réponses TH1 que TH2 et définissent respectivement un profil « inflammatoire » et un profil « régulateur » [2, 3].

L'identification des lymphocytes produisant de l'interleukine 17 ou TH17

En 2005 une étape majeure dans la caractérisation et la compréhension de cette complexité a été l'identification des lymphocytes TH17 capables de produire de l'IL-17 et dont les caractéristiques les distinguent des lymphocytes TH1 et TH2 [4]. Il a été montré que les lymphocytes TH17 produisent de l'IL-17A et IL-17F ainsi que d'autres cytokines qui sont plus ou moins spécifiques de cette sous-population, incluant l'IL-21, l'IL-22, l'IL-26, le TNF-α et l'IL-10 [1, 5-7]. L'IL-17 a pour cible essentielle les cellules épithéliales dans lesquelles elle induit la production de facteurs de croissance (G-CSF [*granulocyte colony-stimulating factor*] et *stem cell factor*), de chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL5 et CXCL8) et de mucines au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Dans certains modèles, l'IL-17A induit aussi la production de β-défensines et de CCL20 [1]. Les lymphocytes TH17 participent ainsi au niveau des épithéliums à la défense contre les bactéries extracellulaires, notamment *Klebsiella pneumoniae* [1]. Cependant, les réponses TH17 sont aussi associées à des maladies auto-immunes, dont la sclérose en plaques, le psoriasis et la maladie de Crohn [1, 17].

Contrôle de la différenciation des lymphocytes TH17

Un élément de controverse des dernières années a concerné les facteurs essentiels à la différenciation des lymphocytes TH17 à partir de lymphocytes CD4 naïfs. Chez la souris, plusieurs études ont confirmé que le TGF-β et l'IL-6 étaient nécessaires et suffisants à ce processus de différenciation [8]. L'IL-21 est produite de façon autocrine au cours de la différenciation TH17 et joue également un rôle essentiel [8]. D'autres cytokines, IL-1β et TNF-α, peuvent augmenter la différenciation mais ne sont pas nécessaires [9]. L'IL-23, cytokine de la famille de l'IL-12, n'influence pas la différenciation TH17 murine mais agit sur les lymphocytes TH17 différenciés – qui acquièrent l'expression du récepteur de l'IL-23 – en augmentant fortement leur expansion *in vitro* [9] et *in vivo* [10].

Ce processus de différenciation TH17 apparaît donc plus complexe que celui qui gouverne la production des lymphocytes TH1 et TH2, respectivement dépendant de l'IL-12 et de l'IL-4 ; surtout un rôle central du TGF-β émerge. En effet, dans ces études murines, seul, le TGF-β est essentiel à la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg), mais, lorsqu'il est associé à l'IL-6, il va orienter la différenciation vers la voie TH17 [8].

Les premiers travaux de différenciation TH17 chez l'homme [6, 11] ont révélé des résultats surprenants en contradiction avec les données murines. Dans une étude, l'IL-1β était le facteur nécessaire et suffisant pour induire la différenciation TH17 alors que dans une autre, c'est l'IL-1 mais également l'IL-23, qui jouaient un rôle prédominant [6, 11]. Dans ces deux études, le TGF-β avait un effet inhibiteur sur la différenciation TH17 ce qui suggérait une différence majeure dans l'im-

Nouvelles.indd 925 29/10/2008 14:35:00

muno-régulation chez l'homme comparée à celle décrite dans le système murin. Ces résultats n'ont cependant pas été reproduits par des études publiées très peu de temps après et montrant notamment que l'IL-1β était suffisante pour faire produire de l'IL-17 aux lymphocytes T CD4 mémoires, mais insuffisante pour générer une différenciation TH17 à partir de lymphocytes T naïfs [12]. Récemment, 3 publications indépendantes, dont une de notre équipe, semblent aboutir à un consensus sur les facteurs nécessaires à la différenciation TH17 chez l'homme et montrent toutes un effet positif du TGF-β *(Figure 1)*. Dans une première étude, les cytokines importantes pour la différenciation TH17 étaient le TGF-β, l'IL-6 mais également l'IL-23 [13]. Par ailleurs, le facteur de transcription ROR-γt était nécessaire à la différenciation TH17, comme cela avait été montré par la même équipe chez la souris [13]. Cette étude a eu le mérite d'utiliser exclusivement des lymphocytes T naïfs purifiés à partir de sang de cordon ombilical pour l'ensemble des expériences, ce qui garantit leur caractère naïf. Dans une deuxième étude, nous avons montré que le TGF-β et l'IL-23 étaient deux cytokines essentielles à la différenciation TH17 chez l'homme, en association avec l'IL-1β et l'IL-6 qui jouaient un rôle similaire [7]. Nous avons aussi montré que chacune des cytokines inductrices de la différenciation TH17 avait un impact très différent sur le profil cytokinique TH17 global [7]. Par exemple, l'IL-1β favorise la production d'IL-17 mais inhibe la production d'IL-10, contrôlant donc l'équilibre entre ces deux cytokines *(Figure 1)*. Nous proposons un modèle où son absence serait associée à un profil TH17 « régulateur », sa présence favorisant un profil « inflammatoire » (potentiellement pathogène) *(Figure 1)*. Ce rôle pourrait être joué chez la souris par l'IL-23, qui inhibe la production d'IL-10 au profit de l'IL-22 [5] *(Figure 1)*. Enfin, une troisième étude s'est concentrée sur le rôle de l'IL-21 et du TGF-β dans la différenciation TH17 et a montré que chez l'homme, ces deux cytokines sont essentielles au même titre que chez la souris [14].

Un consensus récent sur le contrôle de la différenciation TH17 chez l'homme ?

Il ressort de ces trois études que : (1) le TGF-β joue un rôle essentiel dans la différenciation TH17 chez l'homme comme chez la souris ; (2) l'IL-23 joue un rôle important dans la différenciation TH17 chez l'homme contrairement aux études menées chez la souris, différence pouvant avoir des conséquences physiopathologiques importantes ; (3) les cytokines inflammatoires IL-6 et IL-1β contribuent à la différenciation TH17 chez la souris et chez l'homme ; (4) l'IL-21 autocrine semble aussi importante chez l'homme que chez la souris ; (5) le facteur de transcription ROR-γt est une des molécules essentielles à la transcription du gène de l'IL-17, bien que les études chez la souris suggèrent que la régulation transcriptionnelle de la différenciation TH17 est beaucoup plus complexe et requière probablement plusieurs facteurs de transcription agissant de façon coordonnée [15].

Ces résultats sont fondamentaux pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de certaines maladies, notamment auto-immunes, ainsi que pour guider le développement de certaines thérapeutiques qui pourraient cibler la voie TH17. Ils soulignent aussi la difficulté de travailler sur la différenciation T auxiliaire chez l'homme où la définition du caractère naïf des lymphocytes T CD4 repose sur des critères phénotypiques (expression de CD4, CD3, et CD45RA) qui peuvent être pris en défaut. Il apparaît essentiel de vérifier au minimum les résultats majeurs de chaque étude en utilisant des lymphocytes naïfs purifiés du sang de cordon et/ou de disposer d'une technique de purification garantissant non seulement un phénotype $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ mais également l'absence de toute cellule exprimant le CD45RO. En effet, certains lymphocytes mémoires peuvent coexprimer CD45RA et CD45RO [16].

Les caractéristiques essentielles de la différenciation TH17 chez l'homme étant aujourd'hui plus clairement définies, il sera très important d'identifier des facteurs d'inhibition ou d'augmentation des réponses TH17, de préciser les mécanismes moléculaires de la différenciation et notamment l'implication

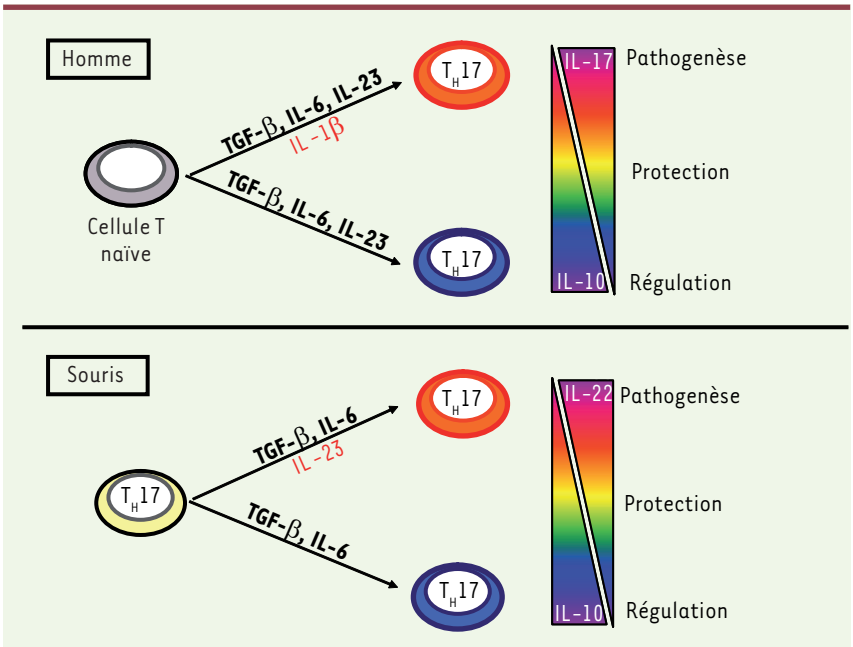


Figure 1. ***Modèle de régulation des réponses TH17.***

Nouvelles.indd 926 29/10/2008 14:35:01

de certains facteurs de transcription, et de tester sur ces modèles humains certaines approches pharmacologiques avant de les développer éventuellement en pathologie. ◊

TH17 differentiation, a complex process in mouse and man

RÉFÉRENCES

1. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008 ; 28 : 454-67.
2. Ito T, Wang YH, Duramad O, *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 1213-23.
3. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells : Th1 cells show self control. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 239-43.
4. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, *et al.* Interleukin 17-producing $CD4^+$ effector T cells develop *via* a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 1123-32.
5. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 1390-7.
6. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007 ; 8 : 950-7.
7. Volpe E, Servant N, Zollinger R, *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 650-7.
8. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008 ; 453 : 1051-7.
9. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006 ; 24 : 179-89.
10. Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 2006 ; 7 : 1151-6.
11. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 942-9.
12. Van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, *et al.* Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 2007 ; 27 : 660-9.
13. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 2008 ; 9 : 641-9.
14. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, *et al.* IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008 ; 454 : 350-2.
15. Sundrud MS. Rao A. Regulation of T helper 17 differentiation by orphan nuclear receptors : it's not just ROR gamma t anymore. *Immunity* 2008 ; 28 : 5-7.
16. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets : function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004 ; 22 : 745-63.
17. Peyrin-Biroulet L, Parmentier-Decrucq E, Branche J, Desreumaux P. L'IL-23R, un nouveau gène de susceptibilité dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 250-2.

Nouvelles.indd 927 29/10/2008 14:35:01

› Grâce à *m/s*, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

› Des articles rédigés par des médecins et des chercheurs reconnus sur la scène internationale qui posent avec rigueur les bases des débats scientifiques.

› Des synthèses, éditoriaux, dossiers techniques et analyses toujours replacés dans leur contexte pour que l'information soit la plus exacte, intelligible et objective.

› La dimension humaine privilégiée, avec l'analyse des retombées diagnostiques, thérapeutiques, la prévention et l'éthique liées aux nouvelles avancées.

› Un panorama clair et concis de l'actualité scientifique : des nouvelles, des brèves, des données chiffrées, des repères et perspectives pour qu'aucun fait significatif ne vous échappe.

Chaque mois,
avec les articles de référence de M/S

Chaque jour,
sur www.medecinesciences.org

Médecine/Sciences
est indexé dans
PubMed/Medline

Current Contents, série Life Sciences
EMBASE/Excerpta Medica
PASCAL
CABS
BIOSIS

Tarifs d'abonnement M/S - 2008
Mensuel - 10 numéros/an

Abonnez-vous à Médecine/Sciences

Mon règlement :

☐ Par mail edk@edk.fr
Uniquement pour les paiements par carte bancaire

☐ Par fax en envoyant ce bulletin au 01 55 64 13 94
Uniquement pour les paiements par carte bancaire

N° ⌊⌊⌊⌊ ⌊⌊⌊⌊ ⌊⌊⌊⌊ ⌊⌊⌊⌊

Date d'expiration ⌊⌊ ⌊⌊ Signature :

N° de contrôle au dos de la carte ⌊⌊

☐ Par chèque à l'ordre de Médecine/Sciences, en envoyant ce bulletin à :

Éditions EDK
2, rue Troyon
92316 Sèvres Cedex, France

Pour recevoir une facture, cochez cette case ☐

Je souhaite m'abonner à M/S :
Nom : ..... Prénom : .....
Adresse : .....
Code postal ..... Ville : .....
Pays : .....
E-mail-obligatoire : .....

Je choisis l'abonnement :

	Particuliers			Institutions			Étudiants*		
	Papier + Électronique	Électronique seul	Papier	Papier + Électronique	Électronique seul	Papier	Papier + Électronique	Électronique seul	Papier
France	☐ 170 €	☐ 118 €	☐ 160 €	☐ 385 €	☐ 235 €	☐ 375 €	☐ 90 €	☐ 62 €	☐ 80 €
UE + autres	☐ 214 €	☐ 118 €	☐ 204 €	☐ 455 €	☐ 235 €	☐ 433 €	☐ 112 €	☐ 62 €	☐ 102 €

* Joindre un justificatif

Nouvelles.indd 928 29/10/2008 14:35:01