

concentration d'As la plus élevée, que devrait éviter le puit. 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 *Sgca*^{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].

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 hétérosécifique effectuées *ex vivo*. Des rétino blastes embryonnaires humains, normalement dépourvus de sarcoglycanes (lignée HER911), sont d'abord

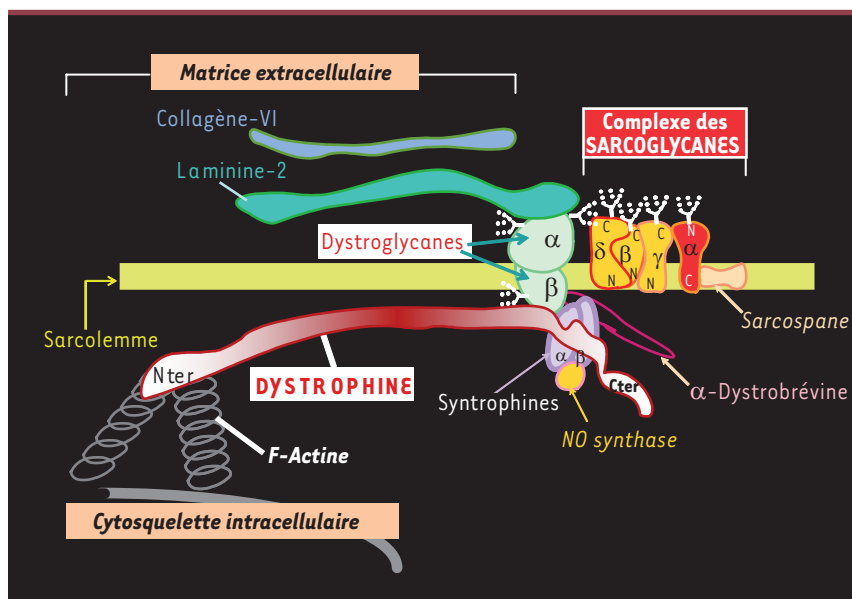


Figure 1. Schéma simplifié de la dystrophin connection. Seules sont représentés les partenaires les plus directs. Les arborescences symbolisent les restes O-glycosylés. La mutation R77C porte sur le gène de l' α -sarcoglycane (en rouge) (modifié d'après [36]).

cotransfectés avec des plasmides contenant l'ADNc des β -, γ - et δ -SG humaines, puis complétés 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'acquies 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 tâtilon, 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 intra-musculaires d'un transgène α -SG humain vectorisé dans l'AAV (*adenovirus 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 intra-musculaire. 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 état d'imperméabilité au bleu Evans. Ces résultats comportent plusieurs preuves de principe très importantes : (1) l'allèle R77C est bel et bien traduit, mais, au cours de sa maturation, la protéine est retenue et détruite par le

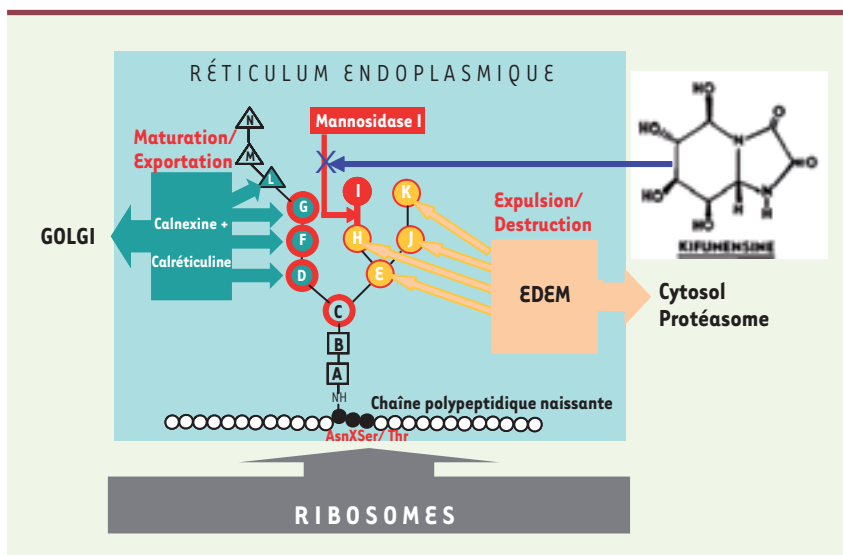


Figure 2. La minuterie du système ERAD par la copule N- oligosaccharidique fixée sur la protéine. Les carrés A et B : résidus N-acétylglucosamines. Les cercles C à K : restes mannosyl. Les triangles L à N : restes glucosyl. Les résidus figurés en vert interagissent avec les protéines chaperons d'aide 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.

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 de la mutation 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 perte

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, 37] (→). 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).

(→) Voir l'article de **Éric Chevet**, page 899 de ce numéro

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 perte post-traductionnelle. D'où l'espoir de pouvoir traiter les formes tardives de maladies de Tay-Sachs ou de Sandhoff [31].



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

- 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.
- 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.
- Roberds SL, Anderson RD, Ibragimov-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.
- Roberds SL, Leturcq F, Allamad V, et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994 ; 78 : 625-33.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 7^e ed. Cambridge : Cambridge University Press, 2001 : 433-63.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991 ; 66 : 1121-31.
- Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, et al. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* 2005 ; 32 : 563-76.
- Holt K, Campbell K. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 34667-70.
- Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* 2007 ; 8 : 177-83.
- Lim L, Campbell K. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 1998 ; 11 : 443-52.
- Trabelsi M, Kavian N, Daoud F, et al. Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 793-803.
- Duclos F, Straub V, Moore SA, et al. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998 ; 142 : 1461-71.
- 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.
- LOVD. Leiden Muscular Dystrophy pages. <http://www.dmd.nl/nmdb/home.php>
- 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.
- 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.
- 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.
- Elbein AD, Kerbacher JK, Schwartz CJ, Sprague EA. Kifunensin inhibits glycoprotein processing and the function of the modified LDL receptor in endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1991 ; 288 : 177-84.
- 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.
- Gregersen N, Bross P, Vang S, Christensen JH. Protein misfolding and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006 ; 7 : 103-24.
- 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.
- 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.
- Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 ; 8 : 519-29.
- Bernier V, Lagacé M, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones : potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2004 ; 15 : 222-8.
- Fan JQ. A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies : use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* 2008 ; 389 : 1-11.
- 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.
- Pey AL, Ying M, Cremades N, et al. Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 2858-67.
- 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.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008 ; 319 : 916-9.
- Foufelle F, Ferré P. La réponse UPR : son rôle physiologique et physiopathologique. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 291-6.
- Yon-Kahn J. Repliement des protéines : études *in vitro*. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 601-7.
- Goldberg ME. Le repliement des protéines : seconde traduction du message génétique. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 563-6.
- Kaplan JC, Delpech M. *Biologie moléculaire et médecine*, 3^e ed. Collection *De la biologie à la clinique*. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2007 : 820 p.
- Chevet E. Inflammation intestinale et stress du réticulum endoplasmique : un lien génétique. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 899-900.

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 glycosyles, 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].