Développement embryonnaire précoce

Un grand rôle pour un petit ARN

Patrick Edery^{1,2,3}, Eudeline Alix^{1,2,3}, Françoise Clerget-Darpoux^{4,5,6}, Anne-Louise Leutenegger^{7,8}

¹ Hospices civils de Lyon, groupement hospitalier Est, hôpital femme-mère-enfant, 6^e étage, 59, boulevard Pinel, 69677 Bron Cedex ;

² UMR CNRS 5292 ; ³ Inserm U1068 ; ⁴ Inserm U781,

⁵ université Paris Descartes, ⁶ hôpital Necker-Enfants malades, 149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15 ;

⁷ Inserm, U946 ; ⁸ université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 27 rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France.

charles.edery@chu-lyon.fr

➤ Le spliceosome est un complexe ribonucléoprotéique qui catalyse l'épissage des ARN pré-messagers situés dans le noyau en réalisant l'excision des introns puis la ligation des exons pour produire des ARN messagers (ARNm) matures, qui sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour être traduits en protéines. Ce complexe est composé de cinq ribonucléoprotéines (*small nuclear RNP*, snRNP) constituées de petits ARN nucléaires (snARN) et de protéines. Notre équipe a récemment montré pour la première fois le rôle d'un petit ARN du spliceosome, U4atac snARN, dans le développement embryonnaire et la survie postnatale chez l'homme [1].

Stratégie d'identification du petit ARN nucléaire U4atac responsable du syndrome de Taybi-Linder

Le syndrome de Taybi-Linder (TALS, MIM 210710) ou nanisme microcéphalique primordial de type 1 (MOPD1) est un syndrome malformatif rare, autosomique récessif, dont l'étiologie était jusqu'à présent inconnue. Ce syndrome a été décrit en 1967 [2] et à ce jour, environ 50 cas ont été rapportés dans la littérature médicale et scientifique (P. Edery *et al.*, en préparation). Le MOPD1/TALS est caractérisé par un retard de croissance intra-utérin et un retard statural postnatal importants, des os longs incurvés et brefs avec un retard de maturation très marqué des épiphyses, des articulations fixées en flexion, une microcéphalie très sévère et des malformations cérébrales

à type d'agyrie ou pachygyrie¹, une dysmorphie faciale caractéristique, une peau sèche et des cheveux rares et fins (Figure 1A-C). Une dégradation rapide et inexpliquée de l'état général et neurologique, qui évolue vers le décès en quelques jours, survient en général avant l'âge de trois ans. En 2006, notre équipe a localisé le gène responsable du MOPD1/TALS dans une région de 13 cM sur le chromosome 2q14 grâce au génotypage de quatre malades appartenant à trois familles consanguines originaires du bassin méditerranéen, avec des marqueurs polymorphes couvrant l'ensemble du génome. Dans cette étude [3], la localisation génétique a été effectuée grâce au développement d'une nouvelle méthode de cartographie par homozygotie utilisant le coefficient de consanguinité réel des malades, estimé d'après leur information génotypique plutôt que d'après les informations généalogiques, qui étaient insuffisantes et imprécises. Nous avons ensuite restreint l'intervalle candidat à une région de 3,19 Mb grâce à une quatrième famille consanguine d'origine méditerranéenne. Le séquençage classique par la méthode de Sanger n'a révélé aucune mutation dans les séquences codantes et introniques flanquantes des gènes situés dans le nouvel intervalle candidat. Nous avons alors effectué, en collaboration avec la société IntegraGen, un séquençage haut débit ciblé de la totalité de la région candidate (cap-

ture Agilent SureSelect™ et séquençage Illumina GAI) chez 10 individus des quatre familles étudiées. Le choix attentif préalable des individus chez lesquels nous séquencerions la région candidate nous a permis d'appliquer les filtres qui ont conduit à l'identification du gène responsable du MOPD1/TALS. Dans deux familles, nous avons sélectionné un enfant atteint (autozygote pour l'haplotype associé à la maladie) et un individu sain de la fratrie ne portant pas cet haplotype, de façon à pouvoir reconstruire les haplotypes des deux parents. Dans les deux autres familles, dans lesquelles il n'existait pas de germain sain non porteur d'un haplotype associé à la maladie, nous avons sélectionné un enfant atteint et ses deux parents (hétérozygotes). Parmi les variations nucléotidiques identifiées, 4 356 différaient de la séquence génomique de référence, dont 1 015 n'étaient pas référencées dans les bases de données dbSNP et du NCBI (*National center for biotechnology Information*). Parmi celles-ci, une seule substitution G>A était retrouvée à la fois à l'état homozygote chez les quatre individus atteints non apparentés et à l'état hétérozygote chez les parents. La mutation récurrente G>A est située en position 51 de la séquence non codante *RNU4ATAC*, transcrite en un petit ARN fonctionnel du spliceosome appelé U4atac [4, 5]. Le séquençage classique par la méthode de Sanger effectué chez tous les individus des quatre familles nucléaires étudiées a confirmé la concordance de la cotransmission de la mutation g.51G>A

¹ Absence (agyrie) ou diminution (pachygyrie) des circonvolutions cérébrales aboutissant à une surface cérébrale lisse.

Figure 1. Phénotype du MOPD1/TALS. **A, B.** Patient en période néonatale. **A.** On note un visage rond, un occiput proéminent, une protrusion oculaire, un nez busqué, un menton petit et en retrait, un cou court, une peau sèche, une absence de cheveux, des contractures articulaires des genoux et des coudes ainsi que des mains et pieds courts. **B.** Radiographies osseuses montrant, aux membres inférieurs, un retard d'ossification des épiphyses tibiales supérieures et fémorales inférieures (les flèches vertes indiquent la position attendue des épiphyses ossifiées, absentes chez le patient), des fémurs courts et incurvés et des métaphyses fémorales discrètement élargies (flèche rouge) et, au niveau de la colonne, un discret aplatissement des corps vertébraux (platyspondylie) et une cyphose lombaire (indiquée par le crochet blanc). **C.** Imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) à l'âge de 1 mois. Kyste arachnoïdien (flèche blanche), hypoplasie cérébrale et pachygyrie (flèche jaune), agénésie de la partie antérieure du corps calleux (la pointe de la tête de flèche rouge montre la position attendue de la partie antérieure du corps calleux, ici absente) et discrète hypoplasie du vermis cérébelleux (flèche bleue).

du snARN *U4atac* avec la maladie. Trois autres mutations du snARN *U4atac* ont ensuite été identifiées chez les patients de quatre autres familles MOPD1/TALS, confirmant le rôle de ce petit ARN dans la pathologie.

snARN *U4atac* et son rôle dans le splicéosome mineur et le processus d'épissage

Le snARN *U4atac* forme une bimolécule avec le snARN *U6atac* (appariement par des nucléotides complémentaires) au cours du processus d'épissage. Au sein de ce duplex, la tige I et la tige II du snARN *U4atac*, qui présentent un appariement nucléotidique intermoléculaire avec le snARN *U6atac*, sont séparées

par une région tige-boucle formée par des appariements nucléotidiques intramoléculaires (Figure 2). Les quatre mutations identifiées dans notre étude sont situées dans cette région tige-boucle du snARN *U4atac*. La modélisation *in silico* de cette tige-boucle montre que les mutations identifiées modifient la conformation bidimensionnelle du site de fixation d'une protéine appelée 15.5K, elle-même nécessaire à la fixation de prp31, une protéine importante pour la stabilisation du tri-snRNP *U4atac/U6atac.U5* et le processus d'épissage. Les mutations identifiées, g.51G>A, g.50G>A, g.50G>C et g.53C>G du snARN *U4atac* sont situées à des positions nucléotidiques relativement

bien conservées entre les espèces. Toutefois, chez certaines espèces comme le poisson zèbre, la séquence g.51G>A est constitutive. Dans ces cas, il existe une « mutation compensatoire » du nucléotide apparié, qui restaure la structure bidimensionnelle de la tige-boucle du snARN *U4atac*. Ce type d'observation indique que la conservation entre les espèces de la structure bidimensionnelle du snARN *U4atac* est plus forte que celle des nucléotides qui le composent. Le snRNP *U4atac* fait partie d'un complexe ribonucléoprotéique appelé splicéosome mineur ou U12, composé également des snRNP *U6atac*, *U5*, *U11* et *U12*.

Le splicéosome U12 permet l'épissage d'environ 700 à 800 introns dans le génome, les autres introns du génome, majoritaires, étant épissés par le splicéosome majeur [6]. Les introns reconnus par le splicéosome U12, ou introns U12, sont caractérisés par leurs séquences consensus d'épissage, en particulier leur site 5' d'épissage et leur site de branchement [7]. La plupart des gènes qui contiennent un ou plusieurs introns U12, ou gènes U12, sont impliqués dans des fonctions cellulaires clés comme la réplication de l'ADN, la transcription, la maturation des ARN et leur transport, la traduction et l'organisation du cytosquelette de la cellule. Certains gènes U12 appartiennent à des familles de canaux ioniques et un petit nombre d'entre eux ont un rôle probable dans le développement embryonnaire osseux ou cérébral. Par des études quantitatives des niveaux d'expression de transcrits, nous avons montré que la présence à l'état homozygote de la mutation récurrente g.51G>A du snARN *U4atac* entraîne un défaut de l'épissage de tous les introns U12 étudiés, sans l'abolir complètement (quantité accrue d'introns U12 non épissés dans les transcrits fibroblastiques des patients par rapport aux individus contrôles). Les mutations du snARN *U4atac* identifiées à ce jour chez les patients MOPD1/TALS entraînent donc une rétention des introns U12 dans les ARNm sans abolir complètement

Figure 2. Modèle bidimensionnel de la bimolécule humaine formée des snARN U4atac/U6atac. La tige-boucle située en 5' du snARN U4atac résulte d'un appariement intramolécule entre nucléotides complémentaires. Les mutations identifiées chez les patients MOPD1/TALS sont situées le plus souvent dans la tige-boucle 5' du snARN U4atac. Le site de fixation de la protéine 15.5K, indiqué par un disque bleu, est nécessaire à l'association avec le snARN U5 (adapté de [10] et [11]).

l'épissage U12 (effet hypomorphe, Figure 3). De plus, le niveau d'expression de certains transcrits U12 était abaissé, posant la question du mécanisme de dégradation de ces transcrits aberrants. Toutefois, le niveau d'expression de la plupart des transcrits U12 étudiés était

normal ou même augmenté. Ces résultats étaient très reproductibles mais ils restent inexpliqués à ce jour. En particulier, le transcrit du gène *PHB2*, impliqué dans des fonctions mitochondriales, était très abaissé dans les fibroblastes des patients de notre étude. Il est inté-

ressant de noter qu'une étude récente [8] a montré que le transcrit *Phb2* (*prohibitin 2*) était également abaissé chez la larve de drosophile mutante, *knock-out* pour le snARN *U6atac*, partenaire de *U4atac*, ce qui suggère un rôle possible du gène *PHB2* - ou des gènes impliqués dans cette voie de signalisation - dans le phénotype MOPD1/TALS. Indépendamment, une autre équipe a identifié la mutation g.51G>A du snARN *U4atac* chez des patients MOPD1/TALS Amish (isolat d'une population de l'Ohio, États-Unis) et trois autres mutations chez deux autres patients, confirmant le rôle du snARN *U4atac* dans ce syndrome [9].

Ces découvertes permettent de formuler des hypothèses sur le rôle possible de nouveaux gènes (U12 ou leurs cibles) dans le développement osseux et cérébral et la survie postnatale. Elles rendent également possible, dans un avenir proche, l'observation directe du rôle du spliceosome mineur dans l'épissage de l'ensemble des introns U12 du génome, grâce au séquençage massif de nouvelle génération du transcriptome des cellules des patients MOPD1/TALS. ♦

Extreme microcephaly and growth retardation caused by mutations in a non-coding RNA component of the minor spliceosome

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

Figure 3. Spliceosome mineur : une fonction vitale. Les défauts de l'épissage des introns de type U12 sont dus à un défaut de la fonction du spliceosome mineur (U12-dépendant). Les mutations MOPD1/TALS conduisent à une accumulation des transcrits pré-messagers non épissés ; 700 à 800 gènes humains contenant des introns U12 ont probablement un niveau d'expression plus ou moins modifié (démonstré dans notre étude [1] pour certains d'entre eux) (d'après [12]).

REMERCIEMENTS

Nous remercions chaleureusement les familles qui ont contribué à cette étude. Ce travail a été financé par la Fondation Yves Cotrel-Institut de France, les Hospices civils de Lyon, le ministère de la Santé et des Solidarités (Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins, plan maladies rares 2004-2008), l'université Lyon 1, l'Inserm et l'association GEN'HOM.

RÉFÉRENCES

1. Edery P, Marcaillou C, Sahbatou M, et al. Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* 2011 ; 332 : 240-3.
2. Taybi H, Linder D. Congenital familial dwarfism with cephaloskeletal dysplasia. *Radiology* 1967 ; 89 : 275-81.
3. Leutenegger AL, Labalme A, Genin E, et al. Using genomic inbreeding coefficient estimates for homozygosity mapping of rare recessive traits: application to Taybi-Linder syndrome. *Am J Hum Genet* 2006 ; 79 : 62-6.
4. Tarn WY, Steitz JA. Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* 1996 ; 273 : 1824-32.
5. Tarn WY, Steitz JA. A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron *in vitro*. *Cell* 1996 ; 84 : 801-11.
6. Alioto TS. U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : D110-5.
7. Sharp PA, Burge CB. Classification of introns: U2-type or U12-type. *Cell* 1997 ; 91 : 875-9.
8. Pessa HK, Greco D, Kvist J, et al. Gene expression profiling of U12-type spliceosome mutant *Drosophila* reveals widespread changes in metabolic pathways. *PLoS One* 2010 ; 5 : e13215.
9. He H, Liyanarachchi S, Akagi K, et al. Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD 1. *Science* 2011 ; 332 : 238-40.
10. Padgett RA, Shukla GC. A revised model for U4atac/U6atac snRNA base pairing. *RNA* 2002 ; 8 : 125-8.
11. Liu S, Li P, Dybkov O, et al. Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. *Science* 2007 ; 316 : 115-20.
12. Pessa HKJ, Frilander MJ. Genetics. Minor splicing, disrupted. *Science* 2011 ; 332 : 184-5.

NOUVELLE

Protéger l'intégrité du réseau vasculaire coronaire Une stratégie efficace pour limiter le no-reflow et la taille de l'infarctus du myocarde

Ariane Galaup¹⁻⁴, Stéphane Germain¹⁻⁵

► D'après l'OMS, les maladies cardiovasculaires demeurent la première cause de décès dans le monde. En 2008, 7,3 millions des 57 millions de personnes décédées ont succombé des suites d'une cardiopathie ischémique et 6,2 millions de celles d'un accident vasculaire cérébral ou d'une autre maladie cérébrovasculaire. En France, l'infarctus du myocarde (IDM) est responsable d'une morbidité importante et de 10 à 12 % de la totalité des décès.

Le phénomène de *no-reflow* lors de la reperméabilisation d'une occlusion vasculaire

L'IDM est une nécrose du muscle cardiaque consécutive à une ischémie due le plus souvent à une thrombose occlusive située au niveau d'une artère coronaire. Cette occlusion résulte dans la majorité des cas d'une fissuration ou d'une rupture d'une plaque d'athérome. Lorsque l'ischémie se prolonge au-delà de 30 min, la nécrose myocardique devient irréversible.

La stratégie thérapeutique de choix dans l'IDM est la reperfusion coronaire, qui doit être la plus précoce possible, réalisée soit par thrombolyse intraveineuse, soit par angioplastie coronaire primaire. Si l'ischémie en aval de l'occlusion est la principale responsable des lésions, il ne faut pas négliger celles qu'entraîne la reperfusion qui suit l'intervention thérapeutique. En effet, la destruction du thrombus génère des débris qui peuvent occlure la microcirculation coronaire. De plus, la reperfusion induit un stress oxydatif, une inflammation et une altération de l'intégrité vasculaire responsables de dégâts cellulaires. Tous ces phénomènes participent au phénomène de non-reperfusion (*no-reflow*) qui survient dans 20 à 40 % des cas et qui est associé à un mauvais pronostic clinique ainsi qu'à une mortalité accrue à 5 ans (pour revue [1-3]). L'étiologie du *no-reflow* est complexe et multifactorielle, mais une de ses caractéristiques est le

¹ Collège de France, centre interdisciplinaire de recherche en biologie (CIRB), 11, place Marcelin Berthelot, Paris, F-75005, France ;
² CNRS UMR 7241, Paris, F-75005, France ;
³ Inserm U 1050, Paris, F-75005, France ;
⁴ MemoLife laboratoire d'excellence Paris Science Lettre, France ;
⁵ AP-HP-hôpital Saint-Louis, laboratoire de pathologie, Paris, F-75010 France.
ariane.galaup@college-de-france.fr
stephane.germain@college-de-france.fr

développement d'un œdème compressif consécutif à l'augmentation de la perméabilité capillaire et aux lésions vasculaires.

L'expression de nombreux facteurs de croissance, dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), est induite par l'hypoxie au cours de l'IDM. En plus de son effet proangiogénique que l'on pense bénéfique à long terme, le VEGF, initialement baptisé VPF (*vascular permeability factor*), possède un effet délétère via l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans les premières heures post-ischémie. La détérioration de l'intégrité vasculaire contribue aux dégâts vasculaires, aux hémorragies, à l'œdème, à l'inflammation, qui, tous, participent au *no-reflow*. Il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique du *no-reflow*. Disposer d'un antagoniste du VEGF spécifiquement actif sur la phase précoce (bloquant l'effet properméabilisation) pourrait vraisemblablement permettre