

Oligophrénine-1, une protéine Rho-GAP impliquée dans une forme non spécifique de retard mental lié au chromosome X

La caractérisation des protéines impliquées dans le développement ou le fonctionnement du cerveau humain représente l'un des grands défis scientifiques des prochaines années. L'étude des retards mentaux d'origine génétique (RM), notamment l'identification de gènes qui en sont responsables et le décryptage des mécanismes physiopathologiques est l'une des approches pour aborder la question des fonctions cognitives.

La recherche de gènes impliqués dans le RM est complexe du fait d'une grande hétérogénéité phénotypique et génétique de la maladie. La plus grande fréquence chez les garçons ainsi que la description de formes familiales dans lesquelles le RM est transmis par la mère ont orienté la recherche de gènes sur le chromosome X. Cette hypothèse [1] fut rapidement confirmée par le clonage du gène *FMR1* impliqué dans le syndrome X fragile. Depuis, de nouvelles formes de retards mentaux liés au chromosome X (RMLX) ont été décrites et certains des gènes responsables ont été identifiés [2]. Les RMLX sont divisés en deux groupes: d'une part, les formes syndromiques (RMXS) dans lesquelles sont associés un RM et un phénotype caractéristique et, d'autre part, les formes non spécifiques (RMX), sans signe particulier. Dans les deux cas, il s'agit de formes familiales qui sont répertoriées selon leur localisation (locus) établie par des analyses de liaison génétique. Alors que la liste des gènes clonés responsables de RMXS s'allonge, seul le gène *FMR2* associé au site fragile E [3] a été identifié parmi les 59 entités RMX décrites [2]. La complexité de l'étude des RMX est liée à leur extrême hétérogénéité génétique et phénotypique. Dans ces conditions, l'analyse génétique permettant la localisation du gène est réalisée indé-

pendamment pour chaque famille; les intervalles génétiques ainsi délimités sont le plus souvent de grande taille et leur exploration à la recherche de gènes d'intérêt reste extrêmement difficile. Des approches complémentaires sont donc envisagées, notamment les études des cas de RM avec des remaniements cytogénétiques tels que des délétions ou des translocations équilibrées entre le chromosome X et un autosome. Dans ces rares cas, les points de cassure chromosomiques désignent directement le locus morbide puisque, *a priori*, ils désorganisent la structure ou l'expression du gène candidat pour le RM. Cette stratégie nous a permis d'identifier un nouveau gène impliqué dans une forme non spécifique de RM. Au cours des deux dernières années, nos recherches ont porté sur un locus situé sur le bras long du chromosome X. Ce locus a été sélectionné après l'observation, chez une femme, d'une translocation réciproque équilibrée t(X;12)(q12;q15) associée à un retard mental modéré [4]. La présence de formes familiales de retard mental non spécifique (MRX 1, 4, 5, 7, 8, 9, 13, 14, 17, 26 et 31; [2]) liés à la région Xq12 ainsi que l'existence de délétions associées à un syndrome de gènes contigus [5] ont orienté nos efforts sur le chromosome X et non sur le chromosome 12.

Afin de positionner précisément le point de cassure, nous avons établi la carte physique de la région, réalisant notamment les *contigs* de YAC (*yeast artificial chromosome*), de PAC (*phage artificial chromosome*) et de cosmides. Au cours de la réalisation du *contig* de cosmides, nous avons caractérisé un fragment de restriction HindIII de 9 kb par lequel passe le point de cassure de la translocation. L'analyse informatique de ce fragment a révélé une identité avec les séquences engendrées par le *Sanger Center* à partir du PAC

360E18. Les séquences disponibles de ce PAC (132 kb) ont permis une recherche informatique de séquences exprimées comprenant, d'une part, la prédiction d'exons potentiels et, d'autre part, la conservation de ces exons par analogie de séquences dans les bases de données. Nous avons ainsi trouvé six exons codants conservés chez différentes espèces. La réalité biologique de ces exons a été confirmée par RT-PCR et les fragments obtenus ont été utilisés comme sondes pour des analyses d'ARNm. Un transcrite de 7,5 kb est détecté principalement dans le cerveau fœtal.

La totalité du transcrite a été isolée en criblant une banque de phages d'ADNc de cerveau fœtal et en réalisant des expériences de RACE-PCR. Tous les fragments chevauchants ont été séquencés, montrant un seul cadre ouvert de lecture de 2 406 paires de bases. Nous avons déterminé la structure du gène, notamment les jonctions exon-intron, en comparant les séquences d'ADNc et d'ADN génomique, et montré que le gène est transcrit du télomère vers le centromère du chromosome X et est composé de 25 exons dont 23 sont codants.

Pour établir son implication dans le retard mental, nous avons, d'une part, étudié les conséquences de la translocation sur l'expression du gène dans une lignée lymphoblastoïde de la patiente. Aucun transcrite n'est détectable, ce qui suggère que la translocation serait associée à l'inactivation fonctionnelle des deux allèles de ce gène, l'un directement par interruption de sa séquence codante et l'autre, indirectement, par inactivation préférentielle du chromosome X normal. D'autre part, nous avons recherché, par DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) et séquençage direct, des mutations

ponctuelles dans quatre cas familiaux de RMX dont les intervalles génétiques couvraient le locus Xq12. Chez un propositus, nous avons pu mettre en évidence la délétion d'un nucléotide responsable d'un décalage du cadre ouvert de lecture et de l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré de la traduction. Cette délétion co-ségrège, selon le mode récessif lié à l'X, avec le phénotype retard mental dans la famille du propositus. Ainsi, ces derniers résultats ont permis de démontrer l'implication de ce nouveau gène, dénommé *Oligophréline-1*, dans le RM non spécifique (oligophrénie). Par ailleurs, cette conclusion est consolidée par les données de la littérature [5]. En effet, les délétions observées chez les patients atteints d'insensibilité aux androgènes (CAIS, *congenital androgen insensitivity syndrom*) associée à un RM emporte une partie du gène *Oligophréline-1*. Le gène *Oligophréline-1* code pour une

protéine de 802acides aminés et de poids moléculaire théorique 91 kDa. Les comparaisons de la séquence protéique avec les banques de données montrent qu'il existe un domaine amino-terminal de 153acides aminés extrêmement conservé même chez *C. elegans* mais dont la fonction est inconnue. Les comparaisons montrent également la présence d'un domaine rho-GAP en position centrale de la protéine. L'alignement multiple de la protéine avec des membres de la sous famille des rho-GAP (figure 1) indique une grande similitude qui s'étend sur 150acides aminés en trois blocs appelés SCR (*structurally conserved region*), spécifiques du domaine rho-GAP [6]. Des tests d'activité GAP, réalisés *in vitro* avec des protéines de fusion, ont confirmé la fonction de ce domaine [7]. Les protéines Rho-GAP sont impliquées dans la régulation des petites protéines GTPases. Ces dernières constituent une vaste superfamille de

protéines de signalisation cellulaire apparentées au produit du proto-oncogène *RAS* et sont divisées en trois principales familles Ras, Rho et Rab (*m/s n° 3, vol. 8, p. 388*). Elles sont caractérisées par leur forte affinité pour le GTP et une faible activité GTPase intrinsèque. Toutefois, la présence des protéines GAP (*GTPase activating protein*), stimule cette faible activité et, de ce fait, les petites protéines G se trouvent liées au GDP sous leur forme inactive (figure 2). La famille Rho est impliquée dans l'organisation du cytosquelette *via* les filaments d'actine et est divisée principalement en trois sous-familles: Rho, Rac et Cdc42 [8, 9]. Leurs rôles sont divers selon le type cellulaire: elles participent à la morphologie et à l'adhérence cellulaire au niveau des fibroblastes, l'agrégation au niveau des plaquettes et des lymphocytes, la rétraction des neurites, la formation de bourgeons chez la levure [10, 11].

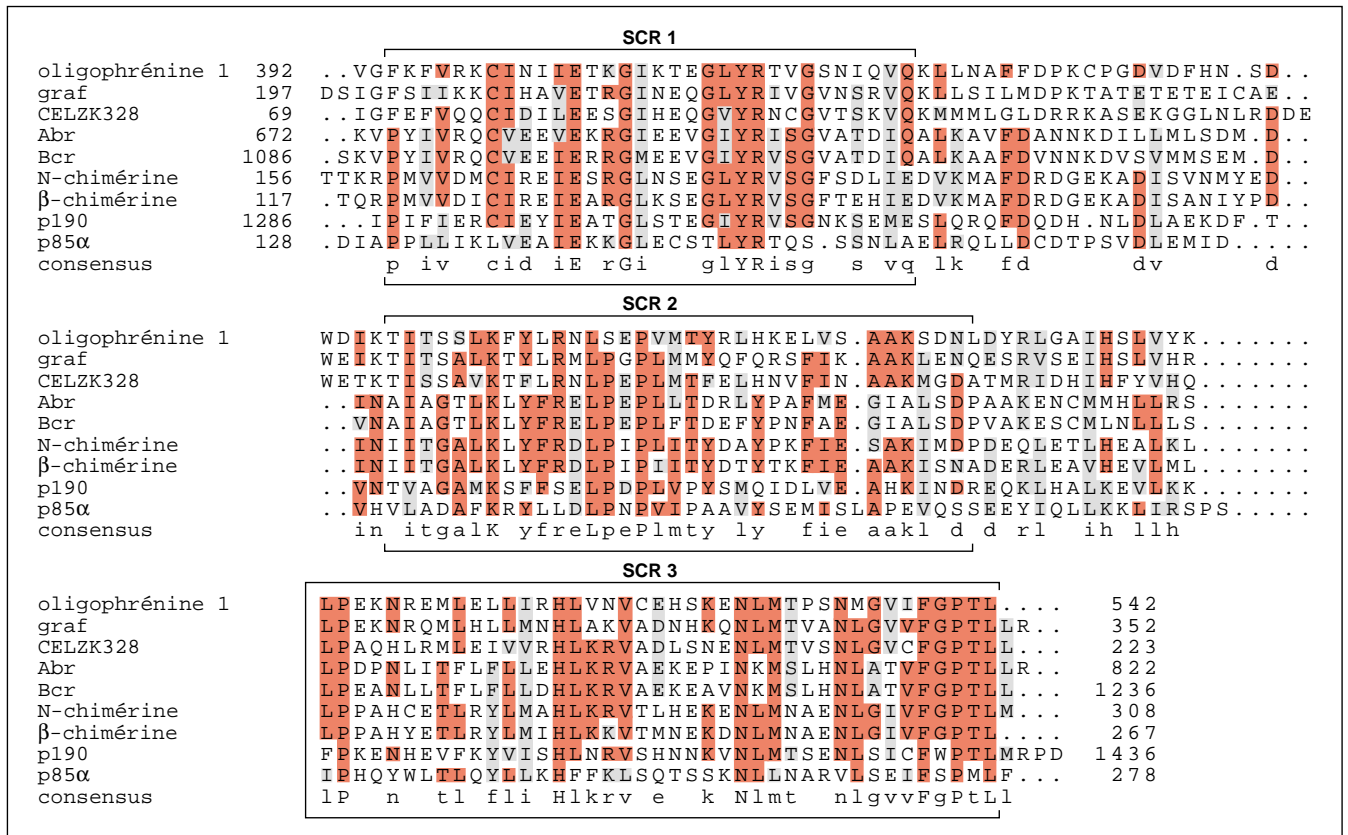


Figure 1. **Alignement multiple du domaine central de la protéine oligophréline 1 avec le domaine Rho-GAP de différentes protéines connues.** Le domaine Rho-GAP responsable de la liaison et de l'activité catalytique avec les protéines de la famille Rho contient trois blocs conservés appelés SCR (*structurally conserved region*).

L'inactivation du gène *Oligophrenine-1* par la translocation, les délétions ou la mutation conduirait à une activation constitutive de(s) la petite(s) protéine(s) Rho cible(s) et donc à une dérégulation du signal qui pourrait avoir des conséquences directes sur la morphologie, le développement des axones ou sur la migration de la cellule neuronale. De tels effets ont été mis en évidence dans des expériences de transgénèse où l'expression d'un mutant actif de *Rac1* dans les cellules de Purkinje de souris modifie l'élaboration des axones et des dendrites [12]. En outre, un article récent [13] a montré que l'expression de mutants actifs de Rho, de Rac ou de Cdc42 conduisent à l'augmentation du nombre de dendrites dans des cellules de cortex en culture. De même Zipkin *et al.* [14] ont caractérisé une nouvelle protéine Rho chez *C. elegans* dont l'activation par des mutations est responsable d'une anomalie de la migration cellulaire et de la croissance axonale. Le retard mental observé chez les patients pourrait être la manifestation clinique de telles modifications au niveau de la cellule neuronale.

L'identification du gène *Oligophrenine-1*, responsable d'un retard mental non spécifique lié à l'X, ouvre de nombreuses perspectives dans les domaines de la génétique médicale et de la neurobiologie. Ainsi, il sera possible de tester l'implication de ce gène (gène candidat) dans toutes les familles de RMX dont la localisation génétique est compatible avec celle du gène; à terme, cela devrait contribuer à éclaircir la nosologie des RMX. En outre, le diagnostic génétique sera proposé aux familles qui le souhaitent, permettant par la suite un conseil génétique fiable. Enfin, il sera très intéressant d'identifier la voie de signalisation cellulaire à laquelle participe la protéine oligophrenine 1 au niveau du cerveau afin, d'une part, de mieux comprendre son implication dans l'organisation des cellules neuronales et, d'autre part, de cerner le mécanisme physiopathologique conduisant au déficit cognitif ■

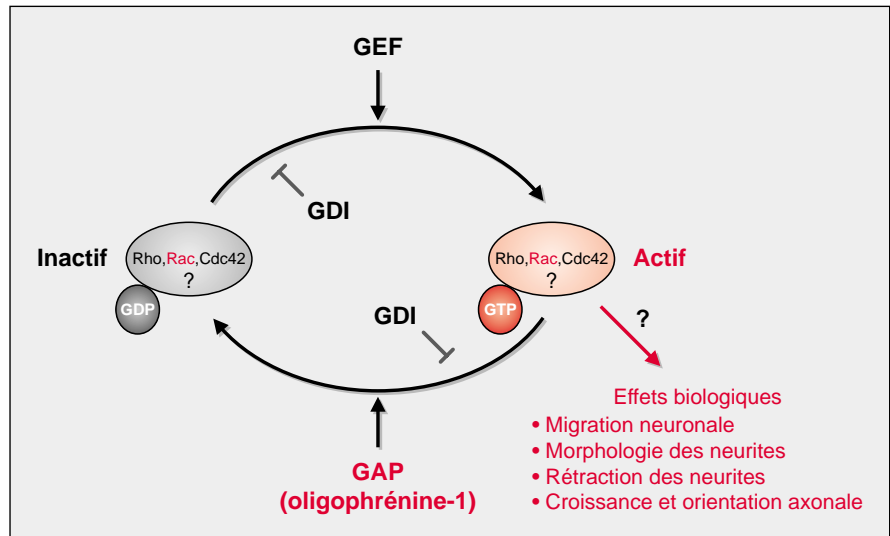


Figure 2. Régulation des protéines GTPases homologues de Ras et hypothèse physiopathologique du retard mental lié à un déficit en oligophrenine
 1. Les petites protéines G évoluent entre deux états, l'un actif (liaison du GTP) et l'autre inactif (liaison du GDP). Les échanges GTP/GDP sont réglés par les protéines GEF (guanine-nucleotide-exchange factors), GDI (guanine-nucleotide-dissociation inhibitor) et les GAP (GTPase-activating proteins). L'absence de protéine GAP entraînerait une activation constitutive de la petite protéine G cible et une perturbation au niveau du système nerveux central des effets biologiques relayés par cette voie de transmission.

RÉFÉRENCES

1. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991; 252: 1097-102.
2. Lubs HA, Chiurazzi P, Arena JF, Schwartz C, Tranebjaerg L, Neri G. XLMR genes: update 1996. *Am J Med Genet* 1996; 64: 147-57.
3. Geckz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 1996; 13: 105-8.
4. Bienvenu T, Der Sarkissian H, Billuart P, Tissot M, des Portes V, *et al.* Mapping of the X-breakpoint involved in a balanced X;12 translocation in a female with mild mental retardation. *Eur J Hum Genet* 1997; 5: 105-9.
5. Davies HR, Hughes IA, Savage MO, Quigley CA, Trifiro M, Pinsky L, Brown TR, Patterson MN. Androgen insensitivity with mental retardation: a contiguous gene syndrome? *J Med Genet* 1997; 34: 158-60.
6. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993; 366: 643-54.
7. Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, *et al.* *Oligophrenin-1* encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* 1998; 392 (sous presse).
8. Zalcman G, Closson V, Honoré N, Olofsson B, Tavitian A. Participation de la cascade des gènes *Rho* à la régulation du cytosquelette: rôle possible dans les mécanismes d'oncogénèse. *Med Sci* 1995; 11: 1551-6.
9. Lamarche N, Hall A. Dissection moléculaire des signalétiques induites par Rac et Cdc42. *Med Sci* 1996; 12: 1421-3.

10. Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 227-31.
11. Aelst LV, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11: 2295-322.
12. Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 1996; 379: 837-40.
13. Threadgill R, Bobb K, Ghosh A. Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac and Cdc42. *Neuron* 1997; 19: 625-34.
14. Zipkin ID, Kindt RM, Kenyon CJ. Role of a new rho family member in cell migration and axon guidance in *C. elegans*. *Cell* 1997; 90: 883-94.

**Pierre Billuart
 Thierry Bienvenu
 Cherif Beljord
 Jamel Chelly**

Inserm U.129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

J. Chelly.