

Le facteur trophique ADNF-9, un tout petit dans les pas des grands !

L'idée qu'il pouvait exister un facteur neuroprotecteur sécrété par les cellules gliales différent de ceux mis en évidence jusque-là est venue à Douglas Brenneman (NIH MD, USA) et Illana Gozes (Institut Weizman, Tel Aviv, Israël) de travaux concernant la neuroprotection assurée par le VIP (*vasoactive intestinal peptide*) [1]. Ce neuropeptide de 28 acides aminés s'est depuis les années 1980 révélé capable de protéger des neurones divers (sensoriels, sympathiques, cérébraux, etc.) contre des atteintes très variées incluant l'excitotoxicité par les analogues du glutamate et la toxicité de la protéine d'enveloppe gp120 du VIH. Brenneman avait toutefois observé il y a dix ans que cet effet du VIP n'était pas direct et passait obligatoirement par la stimulation d'astrocytes [2]. Un certain nombre de facteurs neuroprotecteurs peuvent être produits par les astrocytes mais un paramètre troublait les auteurs : l'activité neurotrophique pouvait être obtenue à l'aide de milieu conditionné astrocytaire extrêmement dilué, trop pour que des facteurs « classiques » puissent être impliqués. Cela les a conduits à rechercher, et à découvrir, une nouvelle molécule, l'ADNF (*activity-dependent neurotrophic factor*), capable d'exercer une action neuroprotectrice à des concentrations femtomolaires (10^{-15} M) [3], alors que l'effet de la plupart des facteurs neuroprotecteurs connus nécessite des concentrations picomolaires, voire nanomolaires dans les mêmes conditions d'expérience.

L'ADNF est une protéine de 14 kD, dans laquelle les auteurs ont identifié une séquence proche de celle de la protéine heat shock 60 (hsp60) qui, de son côté, n'a pas d'activité neuropro-

tectrice évidente, en tout cas pas dans le modèle dont les auteurs ont largement usé, et qui a donné son nom à l'ADNF, dans lequel des neurones meurent après avoir été soumis à une inhibition de leur activité par traitement à la tétródotoxine (TTX). Dans cette séquence homologue de hsp60, ils ont identifié un peptide actif de 14 acides aminés, appelé l'ADNF-14, de séquence VLGGSALLRSIPA*, différant de hsp60 par ses deux sérines qui remplacent deux cystéines. ADNF-14 protège les neurones à des concentrations incroyables, par exemple dès 0,01 fM pour la toxicité de gp120 du VIH ou l'excitotoxicité du NMDA. De façon surprenante, la fenêtre de dose neuroprotectrice efficace était limitée, 10^{-13} M étant inefficace.

Dans une étude très récente [4], les mêmes équipes ont poussé toujours plus loin vers la simplification en identifiant, à l'intérieur de la séquence de l'ADNF-14, un peptide de 9 acides aminés (ADNF-9) encore plus puissant. Ce peptide, de séquence SALLRSIPA, prévient la mort neuronale induite par le TTX à 10^{-17} M mais est encore efficace à 10^{-12} M. Toute modification de sa séquence, et tout ajout d'acides aminés à ses extrémités amino- ou carboxy-terminales, provoque une réduction de son activité neuroprotectrice ou de sa fenêtre de dose active. L'étude de la cinétique d'action de l'ADNF-9 a révélé un post-effet très important puisque 2 heures d'incubation sont suffisantes pour protéger les neurones contre l'effet de 24 heures

de blocage par le TTX. L'ADNF-9 requiert, toutefois, la présence de cellules gliales dans la culture pour être actif à des doses femtomolaires, leur déplétion dans des cultures de neurones purifiés déplaçant la courbe dose-réponse à un niveau picomolaire, mais supprimant par ailleurs la perte d'effet à des concentrations plus fortes, au moins jusqu'au micromolaire. De nouveau l'ADNF-9, comme l'ADNF-14, protège *in vitro* les neurones contre des agressions produites par la gp-120, par le NMDA ou par le peptide β -amyloïde.

Les travaux présentés par les équipes des deux chercheurs lors du dernier colloque de la *Society for Neurosciences*, en novembre à Los Angeles, enrichissent encore la palette des propriétés intéressantes de cette protéine et des peptides qu'elle contient. Tout d'abord, ils présentaient l'ADNC humain de la protéine ADNF complète. Cet ADNC montre une identité de 88,7% avec celui de la souris. Il est exprimé, au moins, dans l'hippocampe, le cortex frontal, le cervelet, le bulbe, le noyau sous-thalamique et la moelle épinière, chez l'adulte et chez le fœtus. Chez le fœtus, il est aussi largement présent dans les poumons [5]. L'expression du facteur au cours du développement est importante car le traitement d'embryons de souris entiers par l'ADNF-9 en culture pendant 4 heures provoque une accélération de la croissance somitique significative, peut-être liée à l'augmentation concomitante de l'expression de l'IGF-1 (*insuline-like growth factor 1*) [6]. Réciproquement, le traitement d'embryons par un anticorps anti-ADNF-14 pendant 6 heures bloque la croissance de façon significative, suggérant fortement l'implication du facteur dans la

* Code à une lettre des acides aminés : A=Ala; C=Cys; D=Asp; E=Glu; F=Phe; G=Gly; H=His; I=Ile; K=Lys; L=Leu; M=Met; N=Asn; P=Pro; Q=Gln; R=Arg; S=Ser; T=Thr; V=Val; W=Tyr; Y=Tyr.

croissance normale, au moins aux alentours du jour 10 de l'embryogenèse [7]. Ensuite, la neuroprotection obtenue par traitement par l'ADNF a été étendue à d'autres modèles, parmi lesquels la dégénérescence *in vitro* de neurones corticaux humains provenant de trisomiques 21 [8], et le trauma crânien chez la souris *in vivo* [9], la protéine étant alors administrée 1 ou 2 heures après le trauma, et la mort neuronale appréciée 24 heures à 30 jours après. Enfin, les auteurs se sont attaqués à l'étude des mécanismes potentiels de la protection induite. Ils ont ainsi révélé que l'ADNF-9 active NF- κ B dans des neurones corticaux protégés contre une atteinte oxydative [10]. L'ajout d'une séquence oligonucléotidique leurre de NF- κ B réduit de façon significative cet effet, soulignant le rôle essentiel de l'activation de ce facteur de transcription dans l'effet neuroprotecteur lorsque les neurones sont isolés. Comme l'effet de l'ADNF est beaucoup plus puissant dans des cocultures contenant des astrocytes, les auteurs ont également regardé les sécrétions induites dans ces cellules par l'ajout du facteur au milieu. Parmi les protéines sécrétées, ils ont ainsi identifié l'IL-1, l'IL-6, le M-CSF et le G-CSF [11], ainsi que les chimiokines RANTES et MIP-1 α [12].

En conclusion, la protéine ADNF, et ses peptides de 14 ou 9 acides aminés,

semble bien être un facteur trophique qui agit au cours du développement sur certaines populations cellulaires, la cible démontrée actuellement étant hors du système nerveux (somites) dans l'attente de nouvelles observations peut-être. Elle est également, et de loin, le facteur neuroprotecteur agissant à la concentration la plus basse sur des populations diverses de neurones centraux. Les mécanismes impliqués peuvent apparemment être directs, par activation de NF- κ B dans des neurones – activation qui jouerait ici un rôle protecteur, ce qui n'est pas le cas dans d'autres systèmes – mais surtout (en tout cas aux concentrations les plus faibles) indirects, liés à la stimulation de cellules macrogliales. Comme l'indiquaient humblement les auteurs en conclusion de leur présentation sur la mort neuronale consécutive à un trauma crânien, voici une liste de qualités qui « suggère l'intérêt d'études complémentaires visant à la définition d'une application thérapeutique potentielle »... pour le moins !

M.P.

1. Brenneman DE, Eiden LE. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1159-62.
2. Brenneman DE, Neale EA, Foster GA, d'Autremont SW, Westbrook GL. Nonneuronal cells mediate neurotrophic action of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Biol* 1987; 104: 1603-10.

3. Brenneman DE, Gozes I. A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J Clin Invest* 1996; 97: 2299-307.
4. Brenneman DE, Hauser J, Neale E, Rubinraut S, Fridkin M, Davidson A, Gozes I. Activity-dependent neurotrophic factor: structure-activity relationships of femtomolar-acting peptides. *J Pharmacol Exp Therap* 1998; 285: 619-27.
5. Gozes I, Zamostiano R, Bassan M, Pinchasov A, Giladi E, Brenneman DE. The human cDNA of a femtomolar-acting activity-dependent neuroprotective protein. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-9.
6. Spong CY, Lee SJ, McCune SK, Brenneman DE, Hill JM. Neurotrophic factors activity dependent neurotrophic factor and early-pregnancy factor: regulation of mRNA for VIP, IGF-1 and EPF during embryogenesis. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-9.
7. Hill JM, Lee SL, Gibney G, Gozes I, Abebe DT, Glazner GW, Brenneman DE. Activity-dependent neurotrophic factor peptides regulate brain and body growth in the prenatal mouse. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-8.
8. Pelsman A, Fernandez G, Gozes I, Brenneman D, Busciglio J. *In vitro* degeneration of Down syndrome neurons is prevented by activity-dependent neurotrophic factor-derived peptides. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-3.
9. Beni-Adami L, Pomeranz S, Bassan M, Gibney G, Brenneman DE, Gozes I, Shohami E. Activity dependent neurotrophic protein is neuroprotective in a mouse model of closed head injury. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-2.
10. Glazner GW, Boland A, Dress A, Brenneman DE, Gozes I, Mattson MP. ADNF-9 protects neurons against oxidative stress-induced death by activation of the transcription factor NF- κ B. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-1.
11. Hauser J, Phillipps TM, Gozes I, Brenneman DE. Activity dependent neurotrophic factor releases cytokines from astroglia. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-5.
12. Brenneman DE, Hauser J, Gozes I, Phillipps TM. Vasoactive intestinal peptide and activity dependent neurotrophic factor release chemokines from astroglia. *Neuroscience Abst* 1998; 24: 417-6.

10^e Cours Francophone de Biologie de la Peau (COBIP)

**Structure et fonctions
Acquisitions récentes
24-25-26 mars 1999 à Lyon, France**

Le COBIP est un cours francophone de biologie de la peau visant à diffuser régulièrement les acquisitions récentes sur les structures et fonctions de la peau humaine. Il s'adresse aux médecins, pharmaciens, biologistes de toutes spécialités, du secteur public ou privé, aux étudiants.

Contact : Madame Nathalie Jacquet
 Inserm Unité 346, Clinique Dermatologique, Pavillon R, Hôpital Édouard-Herriot, 69437
 Lyon Cedex 03, France.
 Tél. : 04 72 11 02 92 - Fax : 04 72 11 02 90