

## Rôle des neurofilaments dans la sclérose latérale amyotrophique

Jean-Pierre Julien

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie des motoneurones qui se caractérise par la présence d'accumulations anormales de neurofilaments dans le péricaryon et la région proximale des axones. Des études récentes à l'aide de souris transgéniques ont suggéré que ces dépôts de neurofilaments pouvaient ne pas être la conséquence de la neurodégénérescence mais leur cause, par un mécanisme impliquant un blocage du transport axonal. Cette hypothèse est confortée par la découverte de mutations dans le gène codant pour la chaîne lourde des neurofilaments (NF-H) chez quelques patients atteints de cette maladie. D'autre part, il existe peut-être un lien entre les neurofilaments et l'activité anormale de la superoxyde dismutase (SOD1); différentes mutations de la SOD1 sont responsables d'environ 2 % des SLA familiales, et des souris transgéniques porteuses d'un gène *SOD1* muté développent une maladie proche de la SLA. En raison de leur abondance et de leur longue demi-vie dans les motoneurones, les protéines des neurofilaments pourraient représenter une des cibles de la toxicité induite par les mutations de la SOD1.

### ADRESSE

J.P. Julien: professeur agrégé au département de neurologie et de neurochirurgie. Centre de recherche en neurosciences de l'Université McGill, Institut de recherche de l'hôpital général de Montréal, 1650 Cedar, Montréal H3G 1A4, Québec, Canada.

**L**a sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi appelée maladie de Charcot, est une maladie neurologique qui se caractérise par la dégénérescence progressive des motoneurones, entraînant la paralysie et la mort. Environ 10 % des cas de SLA sont considérés comme des cas familiaux alors que 90 % sont des cas sporadiques. Des mutations dans le gène codant pour la superoxyde dismutase (SOD1) localisé sur le chromosome

21 sont responsables d'environ 20 % des cas familiaux [1], ce qui ne représente que 2 % de tous les cas de SLA. Mais le mécanisme responsable de la perte sélective des motoneurones par des mutations de l'enzyme n'a pas encore été élucidé.

L'accumulation anormale de neurofilaments dans les motoneurones représente une des caractéristiques pathologiques de la SLA [2, 3]. On les détecte chez plus de 70 % des patients atteints de SLA. Bien que ces

## RÉFÉRENCES

1. Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362: 59-62.
2. Carpenter S. Proximal enlargement in motor neuron diseases. *Neurology* 1968; 18: 841-51.
3. Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1984; 43: 461-70.
4. Côté F, Collard JF, Julien JP. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* 1993; 73: 35-47.
5. Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW. Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 1993; 73: 23-33.
6. Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW. A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 1994; 13: 975-88.
7. Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien JP. Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1757-61.
8. Yamasaki H, Itakura C, Mizutani M. Hereditary hypotrophic axonopathy with neurofilament deficiency in a mutant strain of the Japanese quail. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 427-34.
9. Lee VMY, Otvos L, Carden MJ, Hollosi M, Dietzschold B, Lazzarini RA. Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1998-2002.
10. de Waegh SM, Lee VMY, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating schwann cells. *Cell* 1992; 68: 451-63.
11. Schmidt ML, Murray JM, Lee VMY, Hill WD, Wertkin A, Trojanowski JQ. Epitope map of neurofilament protein domains on cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. *Am J Pathol* 1991; 139: 53-65.
12. Hill WD, Lee VMY, Hurtig H, Murray JM, Trojanowski JQ. Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. *J Comp Neurol* 1991; 309: 150-60.

dépôts de neurofilaments apparaissent à un stade précoce de la maladie, ce phénomène fut longtemps considéré comme un effet secondaire de la dégénérescence, résultant probablement d'un transport axonal défectueux. Cependant, des données récentes suggèrent que les neurofilaments pourraient jouer un rôle clé dans la pathogénie de la SLA. Ainsi, certaines souris transgéniques ayant des accumulations anormales de neurofilaments développent une maladie des motoneurons qui s'apparente à la SLA [4-6]. De plus, des mutations dans le gène codant pour la chaîne lourde des neurofilaments (NF-H) ont été trouvées chez certains individus atteints de SLA (*m/s n° 1, vol. 11, p. 137*) [7]. Nous discuterons ici de ces récentes découvertes et des mécanismes pouvant impliquer les neurofilaments dans la dégénérescence neuronale.

### Structure et fonction des neurofilaments

Les neurofilaments sont formés par la co-polymérisation de trois protéines de la famille des filaments intermédiaires, la NF-L (61 kDa, chaîne légère des neurofilaments), la NF-M (90 kDa, chaîne moyenne des neurofilaments) et la NF-H (110 kDa). Les neurofilaments sont particulièrement abondants dans les gros axones des motoneurons et dans certains neurones des ganglions de la racine dorsale. Outre leur rôle de soutien mécanique, les neurofilaments sont impliqués dans le contrôle du calibre des axones des nerfs périphériques. La démonstration nous en a été fournie par l'hypotrophie des axones observée chez des animaux ayant une déficience en neurofilaments, dont une caille japonaise porteuse d'une mutation dans le gène *NF-L* [8] et une souris au gène *NF-L* inactivé par la technique de recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (Q. Zhu *et al.*, manuscrit en préparation). Les trois protéines des neurofilaments possèdent un domaine riche en hélices  $\alpha$  d'environ 310 acides aminés qui est impliqué dans la formation de filaments intermédiaires (*figure 1*). La sous-unité NF-L est essentielle pour l'assemblage des filaments. D'autre part, les régions car-

boxy-terminales des sous-unités NF-M et NF-H forment des projections latérales à la surface des neurofilaments. Cette région de la protéine NF-H est particulière du fait de sa teneur élevée en acides aminés chargés et une répétition de 43 ou 44 sites de phosphorylation Lys-Ser-Pro chez l'homme [7, 9]. La présence de résidus chargés dans une région de la protéine NF-H qui forme des projections a conduit à l'hypothèse que des changements de phosphorylation pouvaient modifier l'espacement entre les filaments et le calibre de l'axone. Cette hypothèse est confortée par des études chez la souris *Trembler* qui ont montré que la perte de la myéline chez ces souris entraîne une hypophosphorylation de la protéine NF-H qui accompagne un arrangement plus compact des neurofilaments et une réduction du calibre des axones [10].

### Les neurofilaments et les maladies neurodégénératives

On retrouve des accumulations anormales de neurofilaments, souvent appelées corps de Lewy, dans plusieurs maladies dont la SLA [2, 3], la maladie de Parkinson [11, 12] et la maladie d'Alzheimer [11] (*Tableau I*). Les dépôts de neurofilaments sont généralement considérés comme une conséquence d'un dysfonctionnement neuronal mais on ignore à quel point les neurofilaments peuvent directement contribuer à la neurodégénérescence dans ces maladies humaines. On constate que l'accumulation anormale de neurofilaments dans les neurones lésés s'accompagne souvent de la diminution de concentration de l'ARNm codant pour NF-L. Notamment, une diminution de 60% de l'ARNm de NF-L fut rapportée dans les motoneurons de patients atteints de SLA [13]. Une telle réduction dans la synthèse des neurofilaments pourrait entraîner une plus grande fragilité des axones et une diminution de leur calibre. En outre, il est possible que la réduction de la synthèse de NF-L dans la SLA, perturbant la stoechiométrie des protéines des neurofilaments, contribue à la formation de dépôts de neurofilaments. Nous verrons que des changements de la stoechiométrie des sous-unités induits

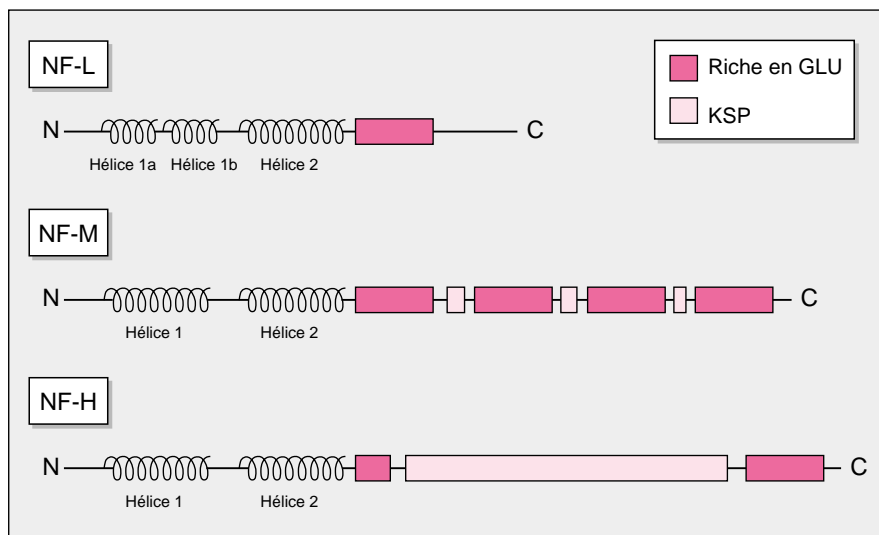


Figure 1. **Structure schématique des trois protéines des neurofilaments.** Les trois protéines NF-L, NF-M et NF-H ont un domaine homologue en hélices  $\alpha$  suivi d'une région carboxy-terminale riche en acides aminés chargés comme l'acide glutamique (GLU). On estime qu'un filament de 10 nm est formé par la co-polymérisation d'environ 32 sous-unités. La région carboxy-terminale de la protéine NF-H, qui forme des projections latérales à la surface du filament, contient de multiples sites de phosphorylation incluant la séquence Lys-Ser-Pro (KSP).

par la surproduction d'une des trois sous-unités de neurofilaments chez des souris transgéniques peuvent provoquer des accumulations anormales de neurofilaments et causer la dégénérescence des motoneurones.

### Les modèles de souris transgéniques avec des accumulations de neurofilaments

Plusieurs modèles de souris transgéniques ayant des accumulations de neurofilaments ont été produits dans différents laboratoires (*Tableau II*). Notre laboratoire a créé plusieurs lignées de souris transgéniques à partir d'un fragment d'ADN génomique du gène humain *NF-H* [4]. Le gène humain *NF-H* demeure sous le contrôle de son propre promoteur ce qui permettait de cibler l'expression de la protéine humaine dans les neurones. Les souris transgéniques qui intègrent de multiples copies du gène humain *NF-H* ont une synthèse de la protéine humaine NF-H multipliée par 2 à 3 et développent une maladie neurologique progressive qui ressemble à la SLA. Les souris transgéniques sont normales à la naissance mais leur vieillissement s'accompagne d'un ralentissement progressif de l'activité motrice. Après 12 mois, certaines souris ont de la difficulté à respirer et peuvent développer des paralysies. Cependant, la plupart des souris *NF-H* sont capables de vivre deux ans sans paralysie complète. Une des caractéristiques pathologiques chez ces souris transgéniques est la présence d'accumulations anormales de neurofilaments dans les motoneurones de la moelle épinière (*figure 2*). Notre hypothèse est que l'excès de la protéine humaine NF-H modifie les propriétés des neurofilaments, entraînant un ralentissement du transport axonal et l'agrégation anormale de ces structures dans les corps cellulaires et la région proximale des axones. Ces dépôts de neurofilaments induisent l'atrophie puis, progressivement, la dégénérescence des axones originaires de ces neurones. L'examen de la racine ventrale L5 de souris transgéniques âgées de 2 ans a montré une dégénérescence importante des axones (*m/s n° 7, vol. 11, p. 1055*) [14]. L'équipe de D.W. Cleveland à San Diego (CA, USA) a aussi créé des sou-

Tableau I

#### DÉPÔTS DE NEUROFILAMENTS DANS DES MALADIES HUMAINES

Maladie	Anomalies	Références
SLA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• accumulations de neurofilaments dans les motoneurones</li> <li>• réduction de 60% de l'ARNm <i>NF-L</i></li> </ul>	[2] [13]
Maladie de Parkinson (100% des cas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• corps de Lewy dans la substantia nigra</li> <li>• réduction de 30% de l'ARNm <i>NF-L</i> et de 70% de l'ARNm <i>NF-H</i></li> </ul>	[11] [34]
Maladie d'Alzheimer (20% des cas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• corps de Lewy dans le cortex</li> <li>• réduction de 70% de l'ARNm <i>NF-L</i></li> </ul>	[33] [35]
Démence avec corps de Lewy	<ul style="list-style-type: none"> <li>• corps de Lewy dans le cortex</li> </ul>	[11]
Guam-parkinsonisme (100% des cas)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dépôts de neurofilaments dans les motoneurones</li> </ul>	[36]
Neuropathies	<ul style="list-style-type: none"> <li>• accumulations de neurofilaments dans les axones périphériques induites par des agents toxiques tels l'acrylamide et l'hexanedione</li> </ul>	[37]

## RÉFÉRENCES

13. Bergeron C, Beric-Maskarel K, Muntasser S, Weyer L, Somerville MJ, Percy M. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 221-30.

14. Collard JP, Côté F, Julien JP. Deficient axonal transport in a transgenic mouse model of ALS. *Nature* 1995; 375: 61-4.

15. Mathieu JF, Ma D, Descarries L, Vallée A, Parent A, Julien JP, Doucet G. CNS distribution and overexpression of light neurofilament proteins in a mouse transgenic for the human light subunit: aberrant accumulation in thalamic perikarya. *Exp Neurol* 1995; 132: 134-46.

16. Ma D, Descarries L, Julien JP, Doucet G. Abnormal perikaryal accumulation of neurofilament light protein in the brain of mice transgenic for human NF-L: sequence of postnatal development. *Neuroscience* 1995; 68: 135-49.

17. Vickers JC, Morrison JH, Friedrich VL, Elder GA, Perl DP, Katz RN, Lazzarini RA. Age-associated and cell-type-specific neurofibrillary pathology in transgenic mice expressing the human mid-sized neurofilament subunit. *J Neurosci* 1994; 14: 5603-12.

18. Eyer J, Peterson A. Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament- $\beta$  galactosidase fusion protein. *Neuron* 1994; 12: 389-405.

19. Wong PC, Marszalek J, Crawford TO, Xu Z, Hsieh ST, Griffin JW, Cleveland DW. Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J Cell Biol* 1995; 130: 1413-22.

20. Marszalek JR, Williamson TL, Lee MK, Xu Z, Hoffman PN, Crawford TO, Cleveland DW. Neurofilament subunit NF-H modulates axonal diameter by selectively slowing neurofilament transport. *J Cell Biol* 1996; 135: 711-24.

21. Rooke K, Figlewicz DA, Han F, Rouleau. Analysis of the KSP repeat of the neurofilament heavy subunit in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 46: 789-90.

22. Vechio JD, Bruijn LI, Xu Z, Brown RH and Cleveland DW. Sequence variants in human neurofilament proteins: absence of linkage to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40: 603-10.

23. Pant H, Veeranna. Neurofilament phosphorylation. *Biochem Cell Biol* 1995; 73: 575-92.

24. Giasson BI, Mushynski WE. Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments. *J Biol Chem* 1996 (in press).

25. Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramaturova A, Krizus A, uchowersky O, Julien JP, Figlewicz D. SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 113-7.

Tableau II

### SOURIS TRANSGÉNIQUES AVEC DES ACCUMULATIONS DE NEUROFILAMENTS

Transgène	Neurones affectés	Dégénérescence axonale	Références
NF-L humain	neurones du thalamus neurones du cortex	? ?	[15, 16]
MSV/NF-L souris	motoneurones neurones des ganglions de la racine dorsale	Oui Non	[5]
MSV/NF-L muté	motoneurones neurones des ganglions de la racine dorsale	Oui Non	[6]
NF-M humain	neurones du cortex	?	[17]
MSV/NF-M souris	motoneurones neurones des ganglions de la racine dorsale	Non Non	[19]
NF-H humain	motoneurones neurones des ganglions de la racine dorsale	Oui Non	[4, 14]
NF-H souris	motoneurones neurones des ganglions de la racine dorsale	Non Non	[20]
NF-H/lacZ	neurones du SNC et du SNP	Non	[18]

MSV: enhancer/promoteur du virus du sarcome murin; LacZ: gène de la  $\beta$ -galactosidase; SNC: système nerveux central; SNP: système nerveux périphérique.

ris transgéniques ayant des accumulations anormales de neurofilaments. Pour obtenir un niveau élevé d'expression de NF-L, des souris transgéniques furent produites avec le gène NF-L de souris sous le contrôle du promoteur du virus de sarcome murin (MSV). Des accumulations importantes de neurofilaments accompagnées d'une dégénérescence des motoneurones dans les premières semaines après la naissance furent observées, la synthèse de la protéine NF-L étant multipliée par quatre par rapport à la normale [5]. Cleveland et ses collègues ont aussi créé des souris transgéniques exprimant une protéine NF-L mutée qui interfère avec l'assemblage des filaments [6]. Il s'agit de la substitution d'un résidu leucine à un résidu proline localisé à la fin de la région riche en hélices  $\alpha$  de NF-L. Le phénotype de ces souris est très prononcé. En moins de quatre semaines, les souris développent des accumulations massives de neurofilaments dans les motoneurones de la moelle épinière. La maladie s'accompagne aussi de la mort précoce de motoneurones, de neurophagie et d'une dénervation importante des muscles squelettiques

[6]. En fait, les changements pathologiques chez les souris transgéniques NF-L ressemblent beaucoup à ceux retrouvés chez les souris exprimant le gène NF-H humain. La différence entre ces deux modèles animaux se situe principalement dans la précocité et la progression très rapide de la maladie chez les souris NF-L.

Ces modèles de souris transgéniques permettent d'expliquer en partie la sélectivité cellulaire de la SLA. En effet, chez toutes ces souris, la sélectivité des neurones lésés est remarquable. Bien que les transgènes NF-L ou NF-H soient exprimés partout dans le système nerveux, la dégénérescence n'est observée que dans les motoneurones de la moelle épinière. Il apparaît logique que les motoneurones soient particulièrement susceptibles de développer de telles accumulations de neurofilaments à cause de leur teneur naturellement élevée en neurofilaments. Cela n'exclut pas que d'autres facteurs puissent aussi influencer sur la sélectivité cellulaire. Des accumulations de neurofilaments se retrouvent aussi dans les neurones des ganglions rachidiens chez ces souris transgéniques mais n'entraînent pas leur dégénéres-

cence [4-6]. Notons aussi que, chez ces souris transgéniques, les motoneurons supérieurs du cortex ne subissent pas de changements pathologiques contrairement à ce qui se produit chez les patients atteints de la SLA. Notre hypothèse est que cette population de motoneurons est épargnée chez la souris car, du fait de leur plus petite taille, leur production de neurofilaments est plus faible que celle des motoneurons correspondants chez l'humain.

Pour étudier comment l'enchevêtrement de neurofilaments peut provoquer la dégénérescence axonale, nous avons examiné le transport axonal chez les souris exprimant le gène *NF-H* humain [14]. Il est réduit de façon importante, non seulement pour les protéines des neurofilaments mais aussi pour d'autres protéines du cytosquelette, dont la tubuline et l'actine. L'examen microscopique a aussi mis en évidence une pénurie de mitochondries dans les axones [15]. Ces résultats démontrent que l'accumulation de neurofilaments peut parfois interférer avec le transport axonal d'éléments essentiels au maintien de l'axone et qu'un mécanisme analogue pourrait contribuer à la pathogénie de la SLA chez l'homme. Ce mécanisme de dégénérescence neuronale est illustré de façon schématique sur la *figure 3*.

Notons que les accumulations anormales de neurofilaments ne produisent pas toujours de phénotype apparent ni de dégénérescence axonale. Par exemple, des souris transgéniques exprimant faiblement le gène *NF-L* humain ne développent pas de maladie neurologique apparente bien que des dépôts de neurofilaments aient été observés dans des neurones du cerveau, notamment dans le thalamus et le cortex [15, 16]. Des dépôts semblables de neurofilaments dans des neurones du cerveau ont été rapportés chez des souris transgéniques qui expriment un transgène *NF-M* humain mais sans phénotype apparent [17]. On ignore actuellement si ces accumulations de neurofilaments engendrent des pertes neuronales dans le cerveau.

Il est remarquable que certains types d'accumulation semblent relativement inoffensifs. Par exemple, d'énormes dépôts de neurofilaments sont tolérés sans induire de dégénérescence dans

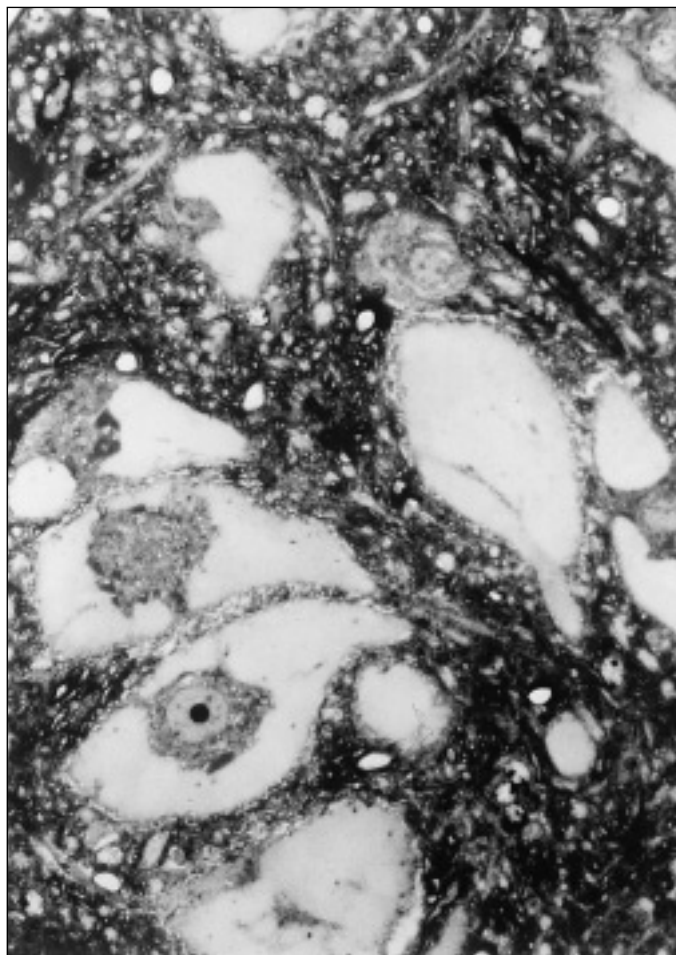


Figure 2. **Accumulation anormale des neurofilaments dans les motoneurons de la moelle épinière chez des souris transgéniques porteuses du gène humain NF-H (x 700).**

les motoneurons de la moelle épinière chez des souris transgéniques exprimant un gène de fusion *NF-H/lacZ* [18] ou exprimant fortement les gènes murins *NF-M* ou *NF-H* [19, 20]. A la lumière du mécanisme présenté sur la *figure 3*, nous pensons que les accumulations de neurofilaments localisées dans la région proximale de l'axone sont plus susceptibles d'être nocives pour le transport axonal que les dépôts localisés dans le péricaryon des neurones.

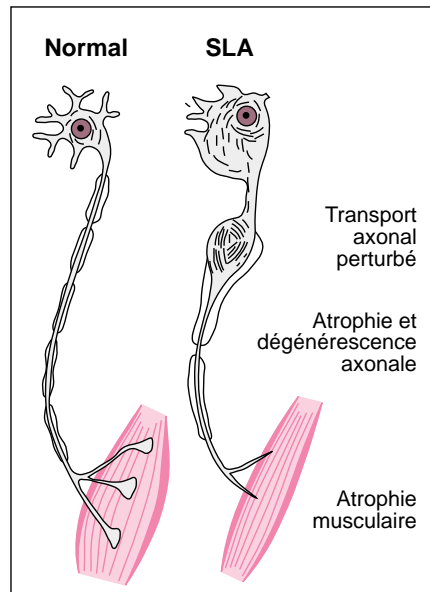
### **Des mutations dans le gène *NF-H* chez des patients atteints de SLA**

La découverte de mutations dans le gène *NF-H* dans quelques cas sporadiques

de SLA est venu renforcer la thèse d'un rôle des neurofilaments dans la pathogénie de cette maladie. Par la méthode de l'amplification de l'ADN à la polymérase (PCR), notre équipe a identifié des pertes de codons chez 5 des 356 cas de SLA sporadiques examinés [7]. Aucune de ces mutations n'a été trouvée dans un groupe témoin de 306 individus. Chez un des patients atteints de SLA, le gène *NF-H* montrait une perte de 102 nucléotides codant pour 5 sites de phosphorylation (*figure 4*). Chez les quatre autres, on a mis en évidence la perte d'un codon lysine qui fait partie d'une séquence consensus pour un site de la phosphorylation. Récemment, un autre laboratoire a découvert deux autres mutations dans la même région du gène *NF-H*

## RÉFÉRENCES

26. Cleveland DW. Neuronal growth and Death: order and disorder in the axoplasm. *Cell* 1996; 84: 663-6.
27. Dal Canto MC, Gurney ME. The development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 1994; 145: 1271-9.
28. Tu PH, Raju O, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VMY. Transgenic mice carrying a human superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3155-60.
29. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS SOD and peroxynitrite. *Nature* 1993; 364: 584.
30. Wiedau Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1996; 271: 515-8.
31. Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER. A gain of function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu, Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5709-14.
32. Chou SM, Wang HS and Komai K. Colocalization of NOS and SOD1 in neurofilament accumulation within motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis: an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 1996; 10: 249-58.
33. Smith MA, Rudnicka-Nawrot M, Richey PL, Praprotnik D, Mulvihill P, Miller CA, Sayre L, Perry G. Carbonyl-related post-translational modification of neurofilament protein in the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1995; 64: 2660-6.
34. Hill WD, Arai M, Cohen JA, Trojanowski JQ. Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. *J Comp Neurol* 1993; 329: 328-36.
35. Crapper McLachlan DR, Lukiw WJ, Wong L, Bergeron C, Bech-Hansen NT. Selective messenger RNA reduction in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1988; 3: 255-62.
36. Rodgers-Johnson P, Garruto RM, Yanagihara R, Chen K-M, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: a 30-year evaluation of clinical and neuropathological trends. *Neurology* 1986; 36: 7-13.
37. Brimijoin S. The role of axonal transport in nerve disease. In: Dyk PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge, R eds. *Peripheral neuropathy*, vol. 1 Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1984: 477-93.



**Figure 3. Modèle de neurodégénérescence par accumulation excessive de neurofilaments.** Chez les souris transgéniques NF-H, les dépôts de neurofilaments dans les motoneurons provoquent un blocage du transport intracellulaire dans l'axone incluant le transport des autres protéines du cytosquelette, comme l'actine et la tubuline, ainsi que les mitochondries. Cela entraîne une atrophie et une dégénérescence progressive de l'axone.

chez 2 des 196 cas de SLA étudiés (A. Al-Chalabi, J.F. Powel, C. Russ et P.N. Leigh, Londres, communication personnelle). Ces deux mutations localisées à des positions adjacentes consistent en des pertes de 18 et de 24 nucléotides qui entraînent la disparition d'un motif KSP (Lys-Ser-Pro) de phosphorylation (figure 4). Encore une fois, aucune mutation ne fut détectée dans le groupe témoin de 188 personnes. L'ensemble de ces résultats indique très fortement que des mutations dans le gène *NF-H* peuvent contribuer directement à la SLA dans un petit nombre de cas (1,3% des cas de SLA). Les recherches pour identifier des mutations dans la région KSP de NF-H [21] ou dans toutes les régions codantes de *NF-L*, *NF-M* ou *NF-H* [22] dans plus de 100 cas familiaux de SLA se sont avérées infructueuses. On peut donc conclure que les mutations dans les gènes de neurofilaments ne sont res-

ponsables que d'une faible proportion des cas sporadiques et familiaux de la SLA.

Bien que le mécanisme pathologique induit par des mutations dans la protéine NF-H n'ait pas encore été élucidé, il est probable que les pertes de codons dans la région phosphorylée puissent modifier les propriétés de la protéine NF-H et peut-être perturber le transport axonal, l'assemblage ou les interactions des neurofilaments. Quoiqu'il en soit, la découverte de mutations dans le domaine KSP de NF-H souligne l'importance de la phosphorylation de cette protéine. Il est remarquable que dans quatre cas de SLA, la perte d'une lysine dans la séquence SPKEE (Ser-Pro-Lys-Glu-Glu) transforme un site consensus pour la kinase cdk5 [23] en un site pertinent pour une kinase activée par le stress appelée SAPK [24]. Des agents qui activent la SAPK peuvent induire une hyperphosphorylation anormale de la protéine NF-H dans les corps cellulaires de neurones en culture [24]. Cette découverte récente soulève la possibilité que la phosphorylation anormale de NF-H par le stress puisse conduire à des manifestations pathologiques impliquant les neurofilaments. Cependant il reste à prouver que l'activité de la SAPK peut favoriser la formation d'accumulations anormales de neurofilaments *in vivo*.

### Un lien entre la superoxyde dismutase 1 (SOD1) et les neurofilaments ?

Si les neurofilaments sont impliqués dans la pathogénie de la SLA, comment réconcilier cette hypothèse avec la découverte de mutations de la SOD1 dans environ 20% des cas familiaux de SLA (*m/s n°6, vol. 11, p. 919*) ? Quelques observations permettent de penser qu'un lien existe entre l'activité de la SOD1 et les neurofilaments. Premièrement, des accumulations anormales de neurofilaments ont été observées dans des cas familiaux de SLA avec différentes mutations de la SOD1 [25, 26]. Deuxièmement, des souris transgéniques porteuses d'un gène *SOD1* muté développent aussi des dépôts de neurofilaments dans les axones des motoneurons [27, 28]. Troisième-

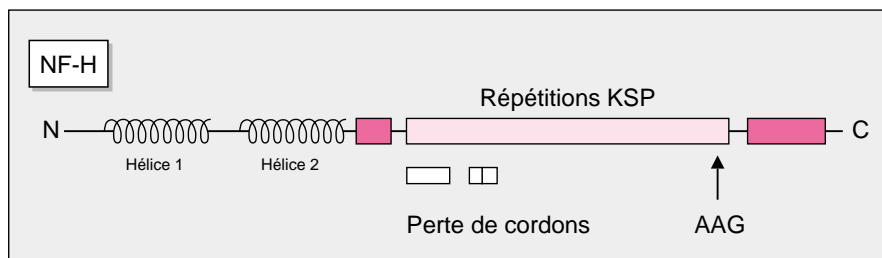


Figure 4. **Mutations du gène NF-H dans des cas sporadiques de SLA.** Il existe deux allèles normaux NF-H, l'un codant pour 43 KSP et l'autre codant pour 44 KSP. Des pertes de codons dans la région des sites de phosphorylation KSP furent identifiés dans le gène NF-H dans sept cas sporadiques de SLA. Des pertes de 6, 8 ou 32 codons incluant un ou plusieurs sites KSP furent trouvées dans trois cas de SLA. Dans quatre autres cas, la perte d'un codon AAG (K) transforme la séquence SPVKEE, un site de phosphorylation pour la *cdk5*, en un site pertinent pour une kinase activée par le stress (SAPK). Aucune de ces mutations dans le gène NF-H ne fut trouvée chez des individus normaux.

mement, on sait maintenant que certaines mutations de la SOD1 associées à la SLA affectent peu l'activité superoxyde dismutase et que la toxicité est causée par le gain de nouvelles activités enzymatiques. Deux mécanismes ont été proposés jusqu'à présent pour expliquer la toxicité des SOD1 mutées. Selon le premier mécanisme, le site catalyseur du cuivre dans la SOD1 deviendrait plus accessible au peroxyde de nitroxy pour former des radicaux conduisant à la nitration de la tyrosine sur les protéines [29]. Selon le second mécanisme, les mutations favoriseraient l'activité peroxydase de la SOD1 ce qui augmenterait la production de radicaux hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène (*m/s n° 3, vol. 12, p. 478*) [30, 31]. Ces deux activités anormales de la SOD1 pourraient endommager des composants cellulaires, dont les protéines des neurofilaments. En effet, les protéines des neurofilaments représentent des cibles de choix en raison de leur abondance et leur longue demi-vie dans les motoneurons. D'ailleurs cette idée est appuyée par une récente publication démontrant la détection par méthode immunohistochimique de nitrotyrosine associée à la protéine NF-L dans les accumulations de neurofilaments dans des cas familiaux de SLA [32]. Une des suggestions actuellement à l'étude est que la nitration de la protéine NF-L pourrait empêcher son assemblage et conduire à la désorganisation des

neurofilaments [32]. D'autres modifications des neurofilaments par des oxydants sont possibles; par exemple, l'oxydation de groupe sulfhydryle ou la présence de carbonyle sur des résidus lysine pourraient susciter la formation de liens covalents interfilairents et induire l'enchevêtrement de neurofilaments. La présence de radicaux carbonyle dans la protéine NF-H fut rapportée dans la maladie d'Alzheimer [33] mais pas dans la SLA.

## Conclusion

L'accumulation anormale de neurofilaments dans les motoneurons est une des caractéristiques de la SLA, y compris dans la forme familiale de la SLA induite par des mutations dans le gène *SOD1*. Les études sur des modèles de souris transgéniques ont montré que cette accumulation est capable de causer la dégénérescence et la mort des motoneurons en perturbant le transport axonal. La thèse que les neurofilaments contribuent à la pathogénie s'appuie aussi sur la découverte de mutations dans le gène *NF-H* chez certains patients atteints de SLA.

Ces découvertes suscitent beaucoup de questions et plusieurs voies de recherche future sont possibles. Afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour la SLA, il apparaît important de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la formation de dépôts de neurofila-

ments, y compris les conséquences de la nitration de NF-L par des mutations de la SOD1. D'autre part, la SLA étant une maladie ayant des causes multiples, on peut penser que pourraient être impliqués dans cette maladie des facteurs capables d'influencer le métabolisme, le transport, la phosphorylation et d'autres modifications des protéines des neurofilaments. Notre laboratoire travaille actuellement à l'analyse de souris dont les gènes de neurofilaments ont été inactivés. Ces souris *knock-out* fourniront des informations précieuses sur les effets de la réduction de synthèse de chacune des sous-unités sur le métabolisme des neurofilaments et sur la fonction neuronale. En outre, ces souris permettront peut-être d'éclaircir le lien entre la SOD1 et les neurofilaments. Des croisements de souris transgéniques visent à évaluer la contribution des neurofilaments à la maladie dégénérative chez des animaux exprimant des gènes *SOD1* mutés. L'absence de neurofilaments chez ces souris transgéniques réussira-t-elle à ralentir la dégénérescence des motoneurons causée par des mutations de la SOD1? ■

## Remerciements

Ce travail a été soutenu par le Conseil de recherches médicales du Canada, la société de la sclérose latérale amyotrophique du Canada et l'Association *Lateral Sclerosis Association* (USA).

## TIRÉS À PART

J.P. Julien.

### ASSOCIATION POUR L'ÉTUDE DE LA PATHOLOGIE PÉDIATRIQUE PRIX 1996

Le Prix de l'Association pour l'Étude de la Pathologie Pédiatrique 1996 d'un montant de 60000 francs a été attribué à **Madame Farida Daikha-Dahmane** pour son mémoire intitulé : *Development of human fetal kidney in obstructive uropathy. Morphology and immunochemistry. Correlations with ultrasonography and urine biochemistry.*

Madame F. Daikha-Dahmane est Assistante-Hospitalier dans le laboratoire du développement de l'Hôpital Robert-Debré (Paris). Le travail a été effectué en grande partie dans l'unité Inserm U.423 que dirige Madame Marie-Claire Gubler.

Il traite des lésions rénales déformatives et malformatives associées aux obstructions urétérales observées chez le fœtus humain et vise à reconsidérer les critères habituels de « dysplasie rénale »

## Summary

### Role of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a late-onset degenerative disease of motor neurons characterized by the abnormal accumulation of neurofilaments in perikarya and proximal axons. Until recently, the depositions of neurofilaments observed in neurodegenerative disorders were widely considered a secondary effect of neuronal dysfunction. However, recent studies with transgenic mouse models demonstrated that neurofilament accumulations can play a causative role in motor neuron disease by disrupting axonal transport. The hypothesis that neurofilaments contribute to ALS pathogenesis is also supported by the discovery of mutations in the gene coding for the neurofilament heavy subunit (NF-H) from some ALS cases. A link may exist between neurofilaments and the abnormal activity of the superoxide dismutase (SOD1) responsible for ~2% of ALS cases. The presence of abnormal neurofilament accumulations in familial ALS cases with different SOD1 mutations and in transgenic mice expressing SOD1 mutants suggest that neurofilaments could be a target of toxicity induced by SOD1 mutants.

### International Symposium on: Vaccinotherapy for Autoimmune and Infectious Diseases, Annecy, France, 5-7 mai 1997.

Contact: Betty Dodet,  
Fondation Marcel-Mérieux,  
17, rue Bourgelat, BP 2021,  
69227 Lyon Cedex 02, France.  
Fax: (33) 72 73 79 93

E-mail: 100765.1401@Compuserve.Com

## INTERACTIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES ENTRE LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE : RÔLE DES PROTÉINES D'ADHÉSION

PARIS, 23-24 AVRIL 1997

Mercredi 23 avril 1997

### INTRODUCTION (9.00-9.15)

#### SESSION 1 : BASES MOLÉCULAIRES DES INTERACTIONS ENTRE LES CELLULES ÉPITHÉLIALES ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

- 9.15-10.00. Les membranes basales épithéliales  
B. Clément, Rennes, France
- 10.00-10.45. Les intégrines : structure, expression et régulation  
A. Sonnenberg, Amsterdam
- 10.45-11.30. Intégrines et signalisation intracellulaire  
K.M. Yamada, Bethesda, USA
- 11.30-12.15. Biologie moléculaire des contacts focaux et des hémidesmosomes  
F.G. Gianciotti, New York
- 12.15-13.00. Les protéoglycans : rôle à l'interface entre cellules épithéliales et matrice extracellulaire  
B. Lelongt, Paris, France

#### SESSION 2 : MATRICE EXTRACELLULAIRE ET PROTÉINES D'ADHÉSION : RÔLE DANS LA MORPHOGENÈSE ET LA DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALES

- 15.00-15.45. Adhésion et morphogenèse : mécanismes généraux  
L. Larue, Paris, France
- 15.45-16.30. L'exemple de l'organogenèse intestinale  
M. Kedinger, Strasbourg, France
- 16.30-17.15. L'exemple de l'organogenèse rénale  
I. Virtanen, Helsinki, Finlande
- 17.15-18.00. Matrice extracellulaire, intégrines et différenciation cellulaire  
M.J. Bissell, San Francisco, USA

Jeudi 24 avril 1997

#### SESSION 3 : IMPLICATIONS EN CANCÉROLOGIE

- 9.00-9.45. Intégrines et contrôle de la prolifération cellulaire  
L.R. Languino, Boston, USA
- 9.45-10.30. Intégrines et régulation de l'apoptose  
P. Möller, Ulm, Allemagne
- 10.30-11.15. Intégrines et cancérogenèse : rôle dans l'invasion et la dissémination métastatique  
M. Pignatelli, Londres, Grande-Bretagne
- 11.15-12.00. Protéines CD44 et cancérogenèse  
P. Lustenberger, Nantes, France
- 12.00-12.45. Interactions entre cellules tumorales et cellules mésenchymateuses pour la production du stroma tumoral  
J. Rosenbaum, Bordeaux, France

#### SESSION 4 : RÔLE DANS LA FIBROGENÈSE

- 14.30-15.15. Rôle des cellules épithéliales dans la fibrose tissulaire : l'exemple des cellules biliaires  
S. Milani, Florence, Italie
- 15.15-16.00. Interactions entre intégrines et protéases  
L. Rémy, Lyon, France
- 16.00-16.45. Intégrines et fibrogenèse : l'exemple du foie  
J.-Y. Scoazec, Paris, France
- 16.45-17.30. Intégrines en physiopathologie rénale  
D. Droz, Paris, France
- 17.30-18.15. Stratégies thérapeutiques anti-intégrines  
J. McGregor, Lyon, France

#### CONCLUSIONS (18.15-18.30)

IFR - Faculté de Médecine Xavier Bichat, B.P. 416, 16, rue Henri-Huchard  
75870 Paris Cedex 18, France  
Tél. : 33 (0) 1 44 85 63 97 - Fax : 33 (0) 1 44 85 63 98