



Compte rendu du 4^e congrès du Consortium international sur les Maladies à Triplets Instables

28 février au 4 mars 2004, Banff (Canada)

**Compte Rendu rédigé par Martine Devillers MD,
AFM, Direction du développement des Thérapeutiques**

Le 4^e congrès du Consortium international sur les Maladies à Triplets Instables a réuni environ 150 chercheurs intéressés par les différents mécanismes, causes et conséquences de l'instabilité de l'ADN.

L'instabilité du DNA

L'appariement complémentaire des bases empêche normalement le DNA double brin de former des structures secondaires. Cependant, le DNA double brin devient transitoirement simple brin durant des processus tels que la réplication, la transcription, la réparation ou la recombinaison et de ce fait, instable. La majorité des mécanismes proposés pour l'instabilité concerne les structures de dérapage du DNA formées par les répétitions, au niveau du DNA non en réplication (à des points de cassure) ou à la fourchette de réplication.

Les questions discutées ont porté sur :

- Où se trouve l'origine de réplication ? la fin ?
- Quels rôles jouent la chromatine, la méthylation du DNA et la transcription dans la réplication ?
- Pourquoi la réplication ne se produit qu'une seule fois par cycle cellulaire ?
- Quels événements de la réplication du DNA permettent de comprendre les bases des maladies humaines en rapport avec des microsatellites instables ?

Toute erreur dans la régulation de la réplication du DNA entraîne une instabilité du génome.

Chez l'homme, l'instabilité des triplets CAG/CTG peut se produire aussi bien dans des cellules en prolifération que dans des cellules quiescentes.

Selon la maladie, le tissu ou le stade de développement, l'instabilité peut se manifester sous forme d'expansions, de délétions ou de maintien de la taille des répétitions.

Dans la dystrophie myotonique, in vitro, il a été postulé que des structures secondaires ou des cassures du DNA dans et à proximité des CTG pouvaient perturber la réplication et/ou les processus de réparation, conduisant à des changements dans la taille des répétitions. Selon la position ou le brin en cause, cela peut induire des contractions ou des expansions.

L'instabilité peut également survenir dans des organismes déficients pour les systèmes de réparation de l'ADN, mais ça n'est le cas ni pour DM (dystrophie myotonique) ni pour HD (maladie de Huntington). Il a été montré chez la souris transgénique porteuse d'amplification CTG que le croisement avec des souris invalidée pour les différents gènes de réparation de l'ADN, Msh2, Msh3, Msh6, entraînait des modifications dans la dynamique des répétitions. Chez la souris DM-MSH2-/- on retrouve une tendance très nette aux contractions (G. Gourdon).

Une erreur de reconnaissance du système de réparation MMR constitue une cause et non pas un système de sauvetage de l'intégrité du génome. Expansions et délétions dépendent tous deux de la capacité des répétitions à former des structures secondaires mais les délétions se produisent durant la réplication, ne font pas intervenir MSH2 et surviennent strictement en tout début du développement alors que les expansions requièrent la présence de MSH2 et surviennent plus tardivement dans le développement.

Des modificateurs de la chromatine (HP1) peuvent moduler le silencing anormal associé à des séquences répétées de DNA et pourraient ainsi modifier la sévérité de certaines maladies. (Festenstein)

Plus les répétitions sont longues, plus elles sont instables, mais l'interruption de l'amplification par des motifs différents pourrait assurer la stabilité des répétitions cf SCA10 (ATTCT).

Dans beaucoup de maladies à triplets, il existe une corrélation positive entre la longueur des triplets répétés et l'âge d'apparition de la maladie. La transmission intergénérationnelle se traduit souvent par une aggravation à la génération suivante, mais pas toujours. Cela dépend en particulier du sexe du parent transmetteur. Dans la dystrophie myotonique, la mère transmet habituellement une forme plus grave à son enfant atteint. Dans SCA10, on observe une relative stabilité intergénérationnelle quand la transmission se fait par la mère. La grande instabilité lors d'une transmission par le père serait due à une forte instabilité des triplets répétés dans le sperme.

Conséquences de l'instabilité

Les séquences répétées peuvent se situer n'importe où sur le génome provoquant des sites de cassure, ou dans un gène. Selon qu'elles se trouvent dans une partie codante du gène ou sur une partie non codante, les

conséquences sont différentes. Dans DM1 et SCA8 les répétitions se trouvent dans la région 3'UTR non codante d'un gène et c'est l'ARNm porteur des amplifications qui est responsable de la pathologie. Le même mécanisme se retrouve dans DM2 où les répétitions situées dans un intron d'un gène codant pour une protéine doigt de zinc, sont traduites en ARN porteur des CCUG. Dans la maladie de Friedreich, les GAA dans l'intron du gène de la frataxine, protéine mitochondriale, perturbent l'épissage ayant pour conséquence, une moindre production de la protéine normale. Les répétitions CGG en 5' dans le gène FMR1 aboutissent à l'absence de formation de protéine FMRP. Dans les maladies à polyglutamine, les répétitions CAG conduisent à la formation d'une protéine anormale insoluble qui forme des agrégats toxiques pour le système nerveux central.

On voit donc que les effets pathogènes potentiels des triplets répétés peuvent survenir à 3 niveaux :

- Au niveau de l'ADN avec un effet en cis sur les gènes voisins (cf SIX5 dans la dystrophie myotonique).
- Au niveau de l'ARN, par gain de fonction toxique de l'ARN muté : le gène porteur des répétitions est transcrit mais non traduit. L'ARNm porteur de grandes répétitions est retenu dans le noyau des cellules où il forme des foci ou inclusions. L'ARNm séquestré capte des protéines qui se lient normalement à d'autres ARN et seraient ainsi empêchées de jouer leur rôle normal dans le métabolisme de ces ARN (cf DM1,DM2, SCA8).
Dans DM1 l'ARNm DMPK porteur des amplifications CUG est séquestré dans le noyau des cellules où il forme des inclusions ribonucléiques. Muscleblind (Mbn1), un régulateur de la transcription, se lie aux répétitions CUG de l'ARN DMPK et ne peut jouer son rôle normal dans le métabolisme des autres ARN au niveau des cellules musculaires. M. Swanson a développé une souris invalidée pour muscleblind qui présente un phénotype de dystrophie myotonique. Il suggère que la restauration de la fonction normale de muscleblind pourrait être une voie thérapeutique pour la dystrophie myotonique.
- Au niveau protéique, provoquant une insuffisance de production de la protéine (cf Ataxie de Friedreich , X fragile avec une absence de FMRP) ou la production d'une protéine anormale, insoluble, qui se dépose dans les neurones comme dans la maladie de Huntington, où la huntingtine forme des agrégats dans les neurones, responsables de la pathologie.

L'amplification de triplets CGG dans le gène FRM1 provoque un défaut de transcription du gène et est responsable de la symptomatologie de l'X fragile. On retrouve trois types d'allèles, les allèles normaux avec moins de 60 CGG, les allèles prémutés qui comptent entre 60 et 200 CGG, et les allèles mutés avec plus de 200 répétitions. Les patients qui présentent une symptomatologie de l'X fragile ont un allèle muté, dont ils ont fréquemment hérité d'un parent porteur d'une prémutation.

FXTAS est un syndrome qui touche environ 1/3 des adultes mâles porteurs de la prémutation du gène FRM1 (50 à 200 CGG)et associe tremblement et ataxie. Des syndromes de défaillance ovarienne prématurée se retrouveraient chez des femmes porteuses d'allèles FMR1 prémutés.

Chez les porteurs de la prémutation, le niveau de la protéine est sensiblement normal, l'ARNm est élevé et anormal, porteur des amplifications de triplets CGG.

Les conséquences des amplifications de triplets sont différentes selon qu'il s'agit d'une prémutation ou d'une full mutation. Dans le 1^{er} cas, l'allèle prémuté est transcrit, produit une quantité diminuée mais non nulle de protéine FMRP, mais se caractérise par la présence de RNA porteur de grandes amplifications CGG. Dans le cas d'une mutation complète, la méthylation du DNA et les modifications de structure de la chromatine sont responsables de l'absence de traduction en protéine du gène muté. Deux tableaux cliniques différents résultent de ces deux anomalies :

- Le syndrome de l'X fragile, due à l'absence de protéine FMRP est la forme la plus fréquente de retard mental mais on n'observe pas de neurodégénérescence. FXTAS, récemment décrit, associe une ataxie et un tremblement, en rapport avec une neurodégénérescence, présent chez environ 1/3 des porteurs d'allèle FMR1 prémutés. Etant donné que les porteurs d'allèles prémutés ont un taux normal de protéine FMRP, on peut en déduire que le mécanisme conduisant à la maladie est différent : le taux élevé d'ARN anormal (porteur d'amplifications CGG) aurait un gain de fonction toxique, comme cela est observé dans la dystrophie myotonique. (Hagerman PJ). Une des principales anomalies observées dans le FXTAS est la présence d'inclusions intranucléaires dans les neurones et les astrocytes dans le cerveau. Des données préliminaires montreraient la présence de ARNm FMR1 dans les inclusions qui aurait un rôle toxique sur les neurones.
- Les maladies à polyglutamine sont un groupe hétérogène de troubles neurodégénératifs d'apparition tardive dues à l'accumulation de protéine insoluble et de mort neuronale prématurée. (DMOP, SCA3 HD) La maladie de Huntington fait partie des maladies neurodégénératives causées par des expansions CAG codant pour une polyglutamine. Ces expansions sont responsables d'une protéine huntingtine anormale insoluble qui forme des agrégats retrouvés dans le SNC , interagit anormalement avec les autres protéines et est responsable de la neurotoxicité expliquant la pathologie.

Thérapeutique

La longueur héritée des répétitions est un facteur déterminant de la sévérité des maladies associées à l'expansion d'une séquence répétée. Plus la répétition est longue, plus la maladie est sévère et d'apparition précoce. Plus la répétition est longue, plus elle est instable dans le stroma et la lignée germinale avec un biais vers les amplifications, responsable de l'aggravation au cours de la vie et d'une génération à l'autre. On voit donc bien que l'instabilité est un facteur critique à considérer en ce qui concerne la thérapeutique.

Des anticorps ciblant spécifiquement la partie N terminale de la protéine ont permis de réduire de façon importante la formation dans les lignées de cellules non neuronales et de diminuer la toxicité des expansions polyglutamine dans les cultures cellulaires de cerveau (A. Messer).

SCA1, autosomal dominant est une maladie neurodégénérative à polyglutamine caractérisée par une dysfonction motrice progressive due à une perte des cellules de Purkinje au niveau du cervelet. H. Orr a développé un modèle murin

conditionnel de SCA1 et montré que, même à des stades tardifs de la maladie, les cellules de Purkinje présentaient des possibilités de réparation.

B. Connor a montré que le cerveau humain adulte était capable de régénération en réponse à une perte neuronale ; ceci est de la plus grande importance pour le développement de nouvelles thérapies dans les maladies neurodégénératives.

La diminution de l'apoptose représente une cible thérapeutique pertinente pour améliorer l'intégrité et la fonction musculaire dans toutes sortes de maladies neuromusculaires,

R. Korneluk a mis en évidence un groupe de gènes qui codent pour des protéines inhibitrices d'apoptose. (IAP) dans des conditions normales et pathologiques, elles agiraient comme des inhibiteurs des caspases. Elles pourraient être utilisées comme des cibles thérapeutiques. La surexpression de IAPs protège les neurones de l'apoptose induite par l'ischémie et prévient la perte neuronale dans un modèle de souris Parkinson. La surexpression des IAP améliore le déficit musculaire observé chez une souris transgénique DM et chez la souris Mdx.

L'X Fragile est causé dans la plupart des cas par des répétitions CGG supérieures à 200 dans le gène FMR1 qui devient méthylé et en conséquence inactif. Le traitement par 5azadC réactive le gène FMR1 et déméthyle les îlots CPG de la région du promoteur. De même, les drogues responsables de l'hyperacétylation des histones potentialisent la réactivation du gène induite par 5azadC. L'ALC approuvée par la FDA diminue l'expression des sites fragiles en modifiant l'acétylation des histones et la méthylation (P. Chiurazzi).

La thérapie génique pour les maladies dominantes où la pathologie est due à un gain de fonction, plutôt qu'à une haploinsuffisance, pourrait viser à supprimer l'allèle malade, tout en conservant l'expression de l'allèle sauvage. C'est ce qu'a testé J. Puymirat dans la DM en utilisant les ARN antisens, les ribozymes et les siRNAs pour cibler spécifiquement les transcrits mutés, en utilisant un promoteur nucléaire. Dans DM, les transcrits mutés sont séquestrés dans le noyau et la technique utilisée consiste à restaurer le niveau des protéines nucléaires. Il a montré que les antisens et les ribozymes diminuaient préférentiellement le niveau des ARN mutés, alors que les siRNAs diminuaient plutôt l'allèle sauvage. Ces effets des antisens et des ribozymes étaient associés à une restauration complète de l'index de fusion des myoblastes, de l'épissage du récepteur à l'insuline et du niveau de la protéine CUG-BP.