

Génétique moléculaire et neurotransmetteurs cérébraux

Jacques MALLET

La neurogénèse résulte d'une succession d'étapes de différenciation conduisant à la formation d'un réseau cellulaire dans lequel chaque élément occupe une position bien établie. Les neurones ne sont pas empilés comme des cubes mais possèdent des prolongements, les dendrites et les axones qui leur permettent en particulier de communiquer avec d'autres neurones situés à des distances allant jusqu'à plusieurs centimètres (**Figure 1**). Le système nerveux comprend également les cellules gliales et les cellules de Schwann dont les fonctions ne sont pas encore complètement élucidées.

Les communications cellulaires entre neurones s'effectuent au niveau des synapses, principalement par l'intermédiaire de petites molécules appelées les neurotransmetteurs. Notons que la mise en place aussi bien des neurones que des contacts

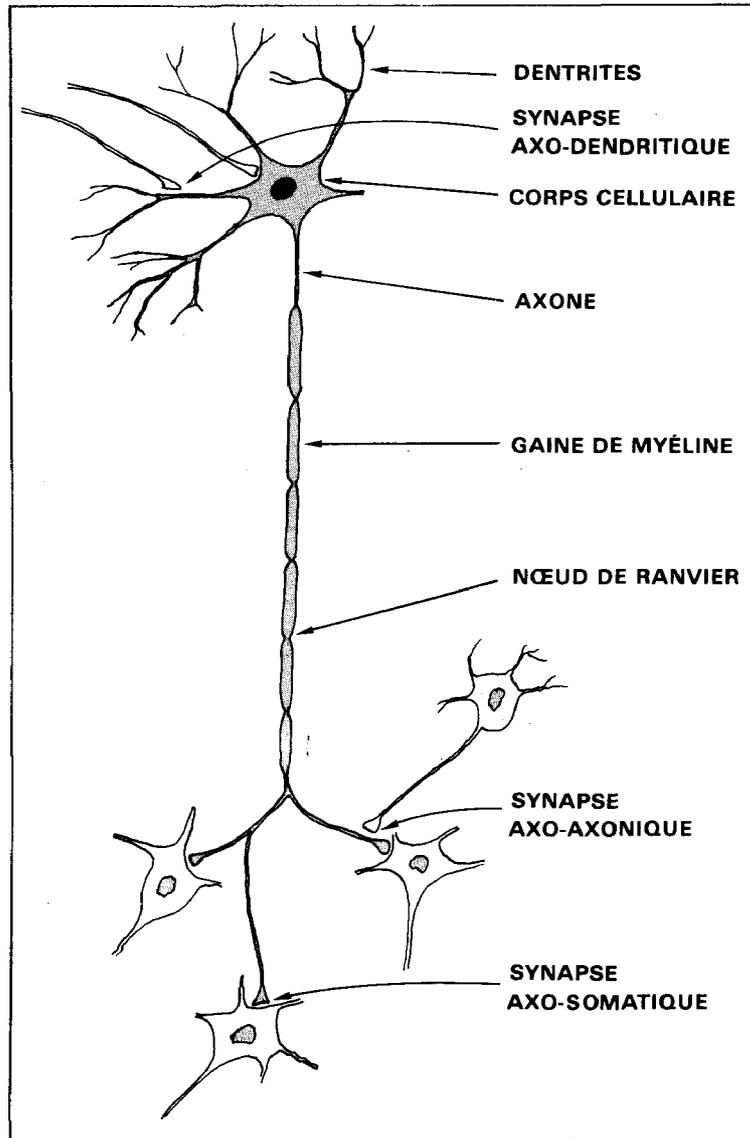


Figure 1

Représentation schématique d'un neurone, de ses différentes parties et de ses relations avec les neurones voisins.

synaptiques est généralement programmée puisqu'il existe des mutants (on en a trouvé chez la souris) caractérisés par l'absence d'une classe particulière de neurones, ou bien seulement d'une catégorie de synapses.

Les neurotransmetteurs libérés au niveau des synapses interagissent avec des molécules (récepteurs) situés sur les neurones voisins. Schématiquement ces interactions vont déclencher des modifications ioniques (potentiel d'action) qui vont se propager des dendrites aux corps cellulaires puis redescendre le long de l'axone pour déclencher à leur tour une libération de neurotransmetteurs dans le fente synaptique.

Comme l'indique la figure n°2, les neurotransmetteurs sont contenus dans des vésicules synaptiques. Ces vésicules, sous l'action du potentiel d'action, fusionnent avec la membrane pré-synaptique et permettent ainsi la libération des neurotransmetteurs. Toutes les molécules ainsi libérées ne sont pas utilisées. Celles qui n'ont pas interagi avec les récepteurs sont soit dégradées, soit recapturées puis stockées par les vésicules synaptiques.

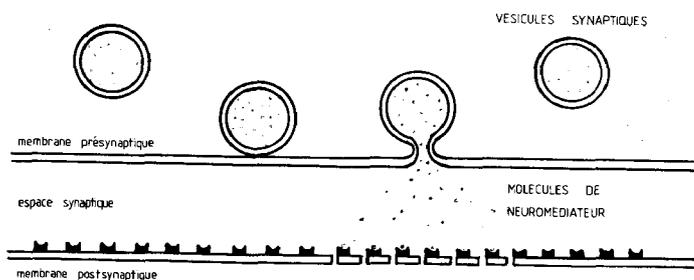


Figure 2

Les neurotransmetteurs apparaissent donc comme des molécules-clé de la transmission synaptique chimique. Une trentaine de substances ont été identifiées et parmi les mieux connues l'acétylcholine, la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline, la sérotonine et le GABA. D'une manière générale un neurone donné utilise un neurotransmetteur principal qui le caractérise. C'est ainsi que l'on parle de neurone ou de système cholinergique ou bien catécholaminergique ou sérotoninergique. Toutefois,

il faut noter, qu'à côté de ces neurotransmetteurs conventionnels, il existe une série de peptides qui sont co-localisés avec ces neurotransmetteurs et qui peuvent également jouer le rôle de neurotransmetteurs ou bien de neuromodulateurs.

Mon exposé portera principalement sur les catécholamines, ensemble de neurotransmetteurs importants que l'on trouve dans le système nerveux central et périphérique et qui comprend la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Les neurotransmetteurs sont synthétisés par différentes enzymes qui sont codées par des gènes. Ainsi l'enzyme-clé de la synthèse des catécholamines, est la tyrosine hydroxylase (TH) qui convertit la tyrosine en DOPA. Une deuxième enzyme, la DOPA-décarboxylase permet ensuite d'obtenir la dopamine. Dans certaines cellules la synthèse s'arrête à ce stade : on parlera alors de neurones dopaminergiques. Dans les neurones noradrénergiques, la dopamine est convertie en noradrénaline.

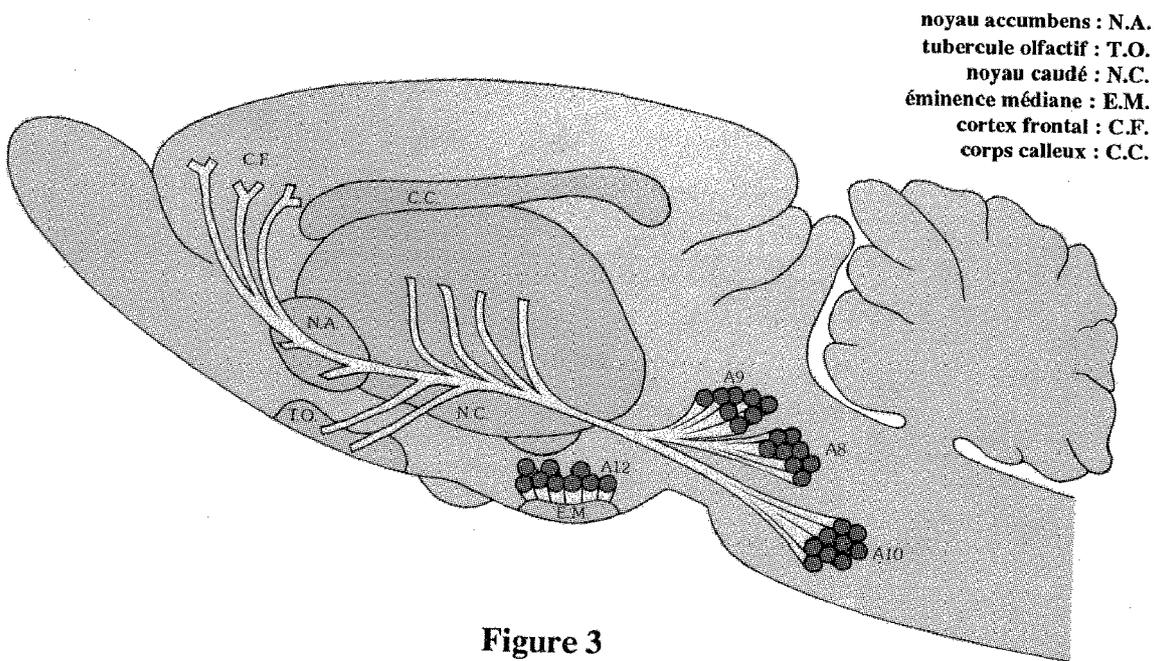
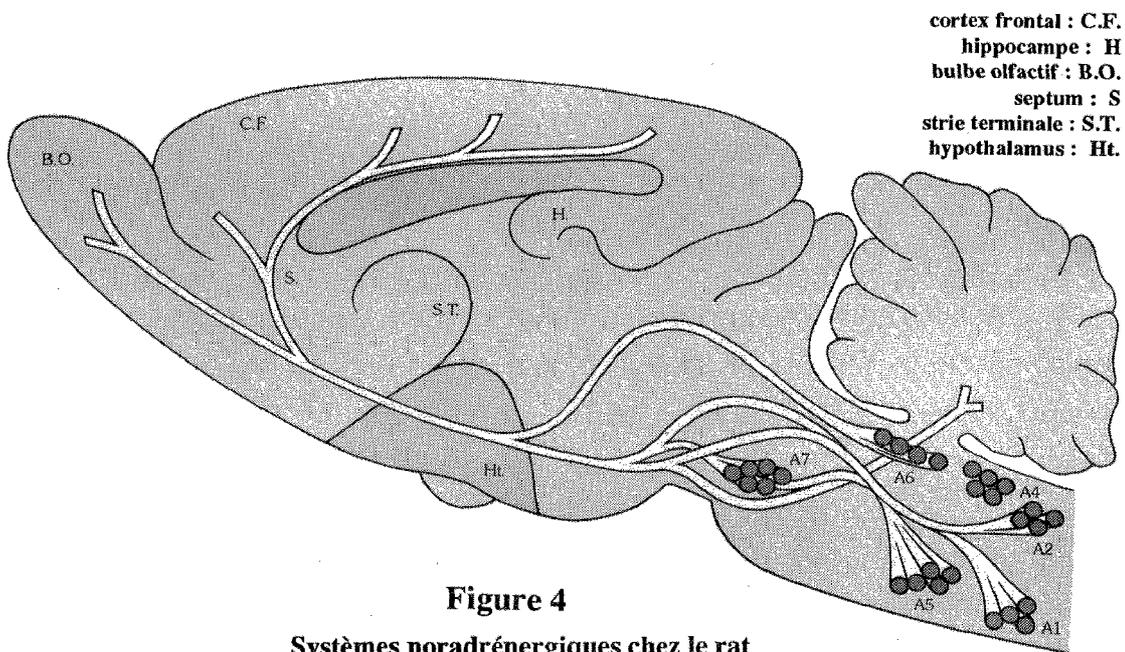


Figure 3

Systèmes dopaminergiques chez le rat

Les principales voies dopaminergiques sont illustrées sur la **figure 3**. On remarquera qu'un nombre restreint de neurones localisés au niveau de la substance

noire se projettent dans différentes régions du cerveau. Une telle organisation sert de support à des fonctions définies. En particulier, différentes données pharmacologiques indiquent que le système dopaminergique joue entre autres un rôle dans les comportements émotifs. Une altération de ce système pourrait jouer un rôle important dans certaines affections psychiatriques. Les principales voies noradrénergiques sont représentées sur la **figure 4**. Le groupe de cellules le plus étudié, noyau A6 ou *locus coeruleus*, se projette au niveau du bulbe olfactif et du cortex frontal. Nous serons amenés à reparler de ce système.



Source : Ungerstedt (1971)

Figure 4
Systèmes noradrénergiques chez le rat

Il est important également de souligner que le choix du (ou des) neurotransmetteur(s) exprimé par un neurone particulier n'est pas prédéterminé. Un neuroblaste possède plusieurs potentialités qui sont révélées par l'environnement cellulaire au cours des migrations et par l'organe cible. Un neurone semble même posséder la capacité de modifier la nature des neurotransmetteurs qu'il synthétise. Ainsi différents travaux ont montré que certaines cellules catécholaminergiques pouvaient devenir cholinergiques et vice-versa. Il apparaît donc que l'expression phénotypique des neurotransmetteurs dans le système nerveux central ou périphérique possède un certain

degré de plasticité. Cette plasticité peut constituer un mode d'adaptation pour certains neurones à un nouvel environnement à la suite, par exemple, de dégénérescences cellulaires. On peut concevoir à l'inverse qu'un changement dans l'expression soit en fait un dérèglement pouvant être à l'origine de pathologies neuropsychiatriques. Il est par contre bien établi que la synthèse des neurotransmetteurs est modulée sur le plan quantitatif par l'activité neuronale. Ces changements peuvent s'opérer à court (quelques minutes) ou à long terme. La stimulation électrique, le stress ou encore l'utilisation de drogues comme la réserpine peuvent entraîner un changement important de l'activité enzymatique tyrosine hydroxylase qui peut durer plusieurs semaines. Il existe donc une interaction importante entre l'environnement et l'expression tant qualitative que quantitative de certains gènes qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du système nerveux central. L'étude des mécanismes responsables de ces régulations requiert l'isolement des gènes impliqués.

Avant de centrer notre propos sur le gène qui code pour la tyrosine hydroxylase, rappelons quelques notions de génétique moléculaire. Le matériel génétique contenu dans les chromosomes, l'ADN, est un long filament à deux brins composés de nucléotides. Chaque nucléotide contient une des quatre bases (A.T.C.G.) dont l'enchaînement dans la molécule d'ADN détermine le code génétique. On appelle gène un fragment d'ADN chromosomique qui contient la séquence de bases déterminante pour la synthèse d'une protéine donnée. Dans les organismes supérieurs les parties généralement codantes des gènes qualifiés «d'exons» sont interrompues par des séquences intermédiaires non informatives appelées «introns».

L'information n'est pas traduite directement en protéines. Le brin codant de l'ADN est d'abord transcrit en un brin complémentaire, un acide nucléique semblable mais monocaténaire, l'ARN messager (ARNm) (**Figure 5**). Le produit de transcription primaire de l'ADN fabriqué dans le noyau de la cellule y subit des modifications avant d'être exporté sous forme d'ARN dans le cytoplasme. Au cours de ces opérations, les introns sont excisés et les exons sont reliés les uns aux autres, l'ARN mature

est alors traduit en protéines. Un exon donné peut dans certains cas être excisé. Ainsi, l'ARN messenger provenant du gène représenté sur la **figure 5** peut contenir les quatre exons (cas A) ou bien simplement les exons 1, 3 et 4 (cas B) ou 1, 2 et 4 (cas C). L'ARN pré-messager peut donc donner naissance à différents ARN messagers. Par ce mécanisme d'épissage différentiel, un même gène peut diriger le synthèse de protéines différentes (A, B ou C sur la **figure 5**).

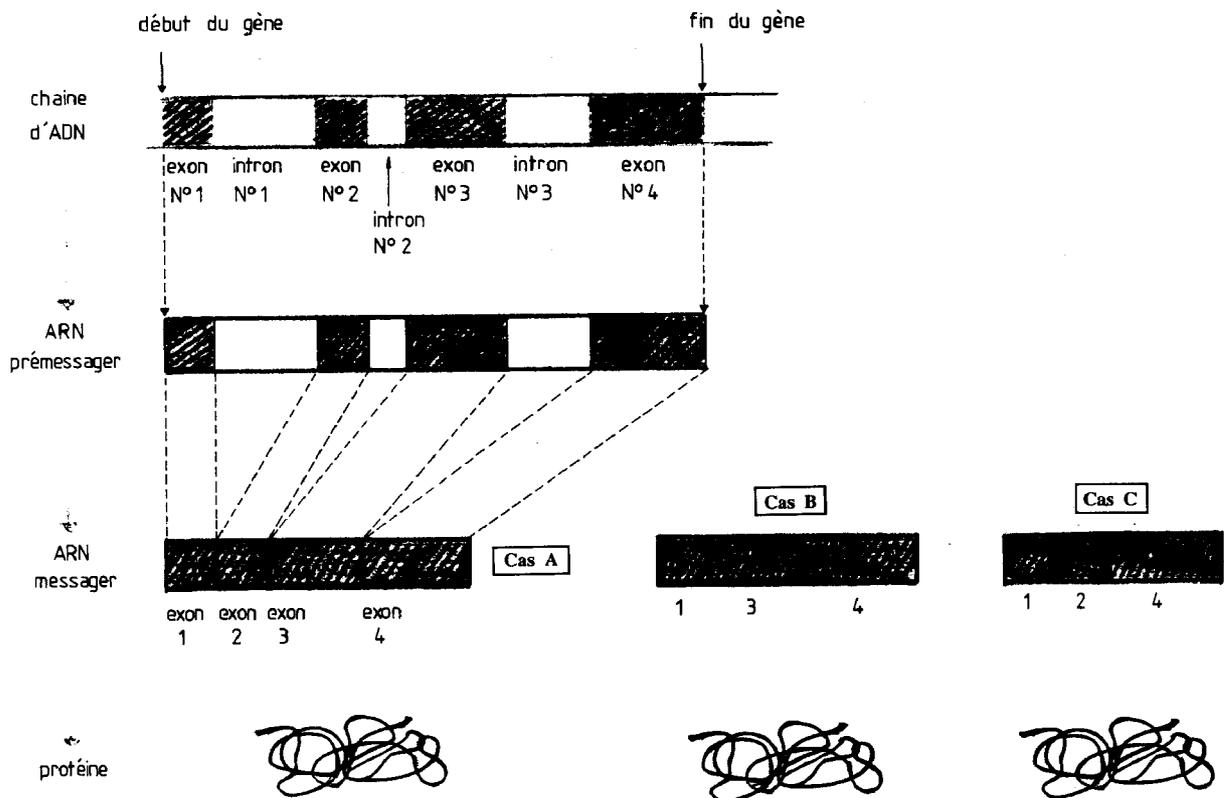


Figure 5

Les régulations de l'expression d'un gène donné peuvent s'effectuer au niveau de sa transcription au niveau de l'épissage de l'ARN pré-messager, au niveau de la traduction de cet ARN messenger et enfin au niveau des différentes modifications post-traductionnelles. En effet, les protéines peuvent être par exemple glycosylées ou phosphorylées. La qualité de la protéine ainsi que son niveau d'expression nécessitent le déroulement sans faille de toutes ces étapes. La **figure 6** résume les principales étapes inhérentes au clonage d'un gène, c'est-à-dire l'isolement d'un fragment du

patrimoine génétique qui porte cette information. Cet isolement ne peut pas en général se faire directement et exige la maîtrise de nombreuses techniques qui reposent principalement sur la possibilité de remonter «de l'ARN à l'ADN». Ensuite l'ADN complémentaire est introduit dans un vecteur, par exemple, un plasmide qui va permettre d'en obtenir de nombreuses copies puisque le plasmide peut se multiplier dans une bactérie. En résumé à partir d'ARN en solution, on obtient des colonies recombinantes; chaque colonie possède un type unique de plasmide correspondant à un ARN messager unique. Différentes méthodes permettent ensuite d'isoler la bactérie qui contient le plasmide codant pour la protéine considérée.

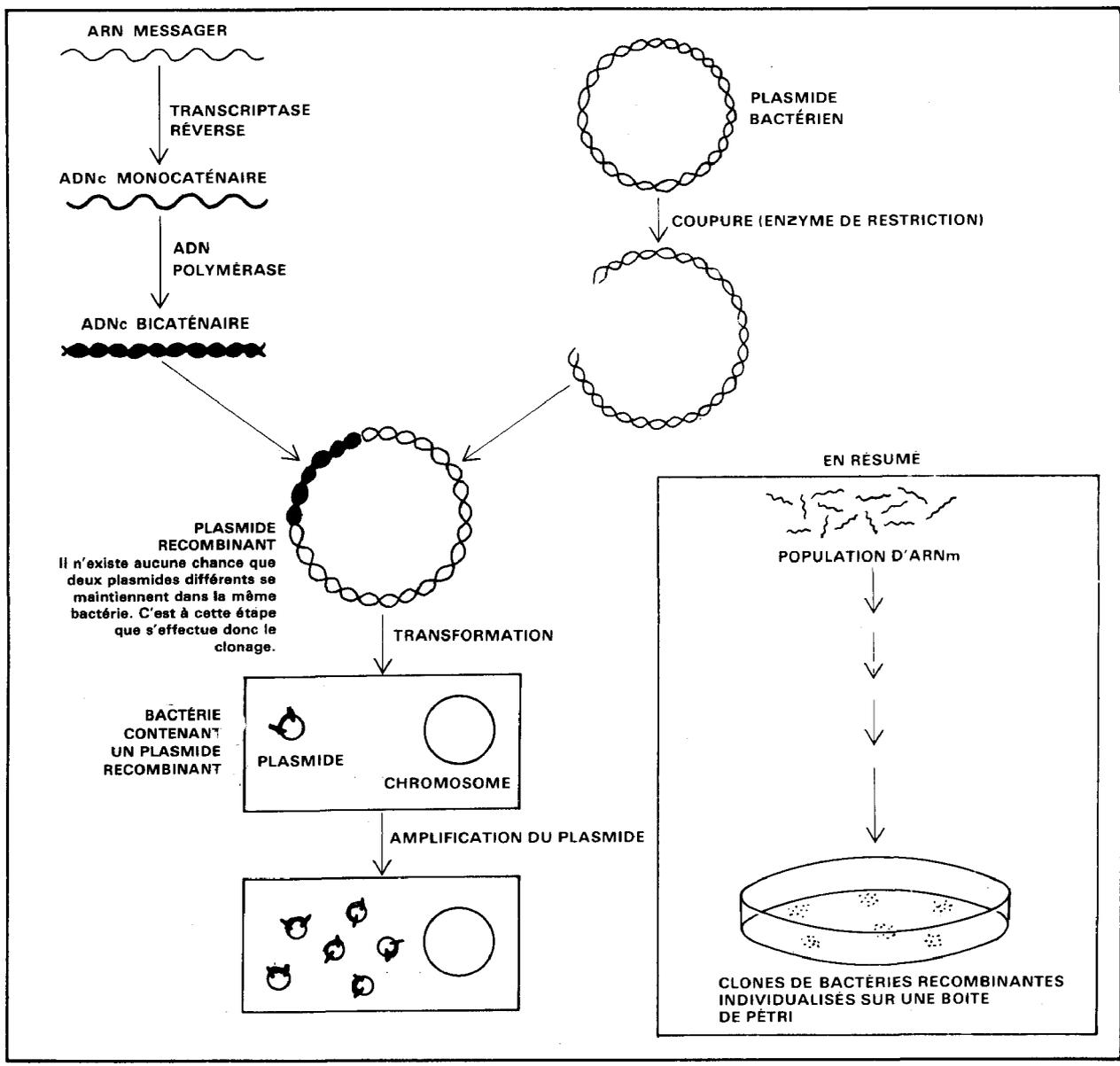


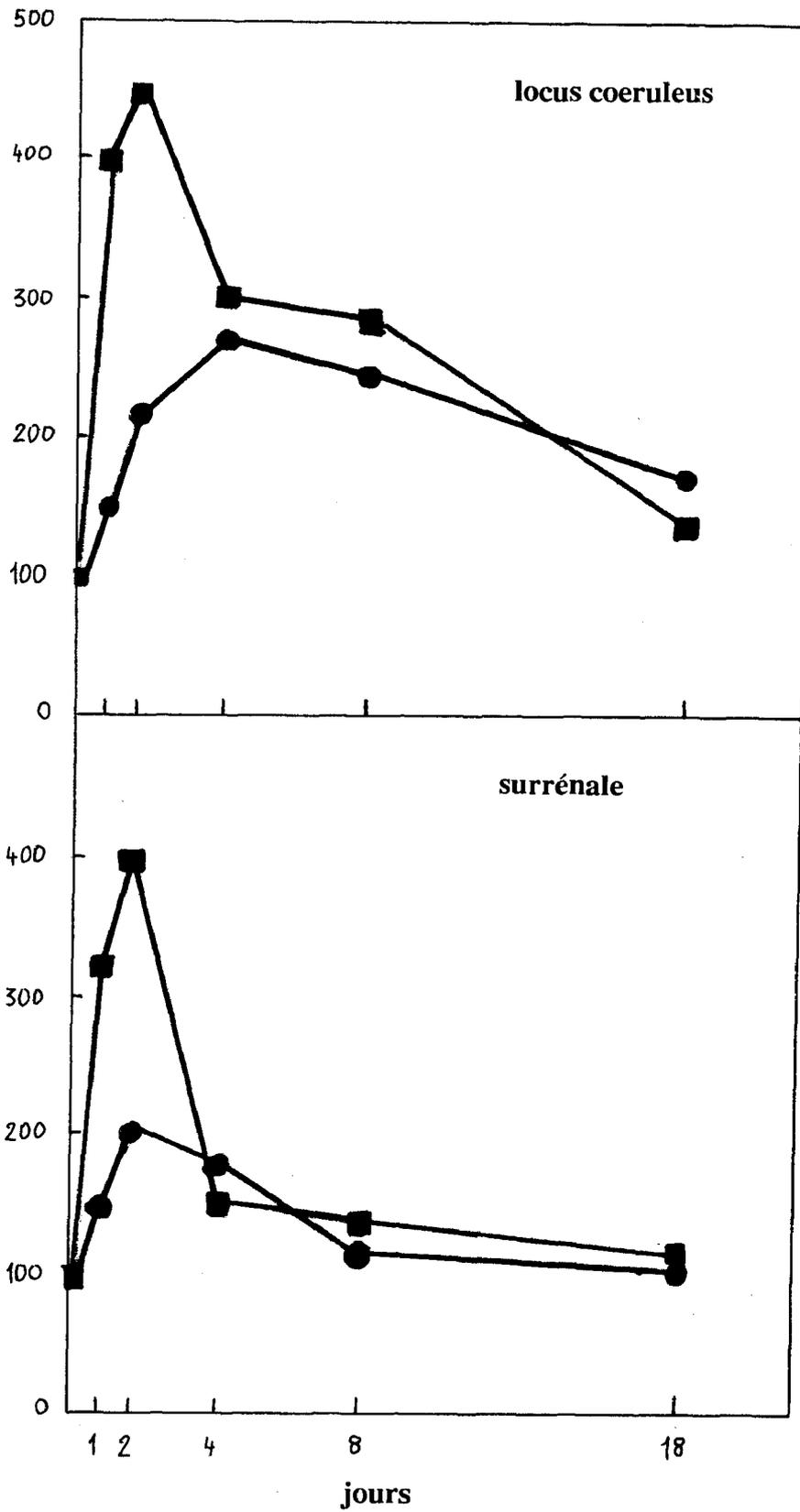
Figure 6

Les principales étapes de la synthèse et du clonage d'ADN complémentaires.

Dans le cas de la tyrosine hydroxylase de telles manipulations ont permis d'isoler un ADN_c (ADN complémentaire de l'ARN messenger) qui code pour la totalité de la molécule. Il était alors facile de déterminer l'enchaînement des nucléotides correspondants et d'en déduire l'enchaînement en acides aminés de l'enzyme. De nombreuses informations devenaient alors disponibles. Ainsi nous avons pu montrer que la tyrosine hydroxylase était formée de deux domaines spécifiques : le domaine catalytique (C-terminal) permet la conversion de la tyrosine en DOPA tandis que le domaine régulateur (N-terminal) module l'activité enzymatique par le biais de groupements phosphates qui sont ajoutés par des enzymes au niveau d'acides aminés particuliers, les sérines au nombre de trois dans la séquence régulatrice considérée. Un changement d'activité neuronale, à court terme, va modifier le nombre de ces groupements phosphate et par là même l'activité enzymatique. Nous sommes en mesure d'effectuer ces modifications *in vitro* et de déterminer quantitativement le rôle respectif des groupements phosphate sur l'activité de cette enzyme.

Les modifications à long terme de l'expression de la tyrosine hydroxylase (TH), ont été analysées en prenant comme modèle l'action de la réserpine. Cette molécule empêche le stockage des catécholamines dans les granules de sécrétion. L'absence de neurotransmetteurs dans la fente synaptique entraîne alors par un effet de feedback une stimulation pré-synaptique des neurones. Plus précisément nous avons étudié les modifications de l'activité TH et du taux d'ARN messenger correspondant d'une part au niveau des glandes surrénales et d'autre part du *locus coeruleus* qui constitue le principal noyau noradrénergique du système nerveux central. Les augmentations relatives de l'activité et du taux d'ARN_{TH} chez les rats traités par rapport au contrôle ont été étudiés (**Figure 7**). L'augmentation de l'activité enzymatique observée après injection de réserpine est précédée d'une augmentation du taux d'ARN messenger résultant d'une transcription accrue du gène de la tyrosine hydroxylase. L'effet est beaucoup plus prononcé au niveau du locus coeruleus que dans les surrénales. Ainsi 18 jours après le traitement, l'activité enzymatique est encore deux fois plus élevée chez les rats traités par rapport aux témoins. Par contre, au niveau des surrénales l'effet n'est plus significatif après une semaine. La persistance de l'augmentation de l'activité TH au niveau du *locus coeruleus* pourrait résulter d'une stabilisation préférentielle de l'ARN messenger dans cette structure ; cet effet viendrait donc s'ajouter à l'augmentation de la transcription du gène. L'élucidation fine de ces mécanismes apporterait des éléments

Figure 7



Augmentation (en %) relative par rapport au témoin

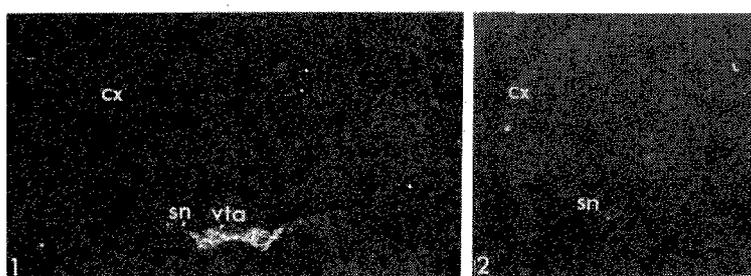
- activité de la tyrosine hydroxylase
- taux d'ARN messager de la tyrosine hydroxylase

essentiels à la compréhension des effets physiologiques de longue durée. Ils permettraient d'appréhender certains processus qui interviennent dans les phénomènes de mémoire.

Un des points cruciaux consiste à déterminer les éléments responsables de la transcription du gène TH et de la modulation de son expression. De tels mécanismes commencent maintenant à être décortiqués dans certains systèmes simples. Des protéines spécifiques qui interagissent directement avec l'ADN ont pu être isolées. L'isolement de ces protéines permettrait de concevoir de nouvelles approches thérapeutiques. Jusqu'à présent, la pharmacologie s'est limitée à la conception de substances qui modifient le fonctionnement du produit d'un gène (enzyme, récepteur). Il est maintenant possible d'imaginer de modifier l'expression même du gène en intervenant au niveau des protéines qui modulent son expression. En fait c'est par un tel mécanisme qu'agissent certaines molécules, telles que les stéroïdes.

Pour aller plus loin dans l'étude de l'expression des gènes, les ARN messagers doivent être repérés et analysés directement sur coupe de tissu, compte-tenu de la diversité et de la complexité anatomique du cerveau. Cela est maintenant possible grâce aux méthodes dites d'hybridation in situ. Ainsi un ADNc donné va reconnaître spécifiquement l'ARN messager correspondant sur la coupe de tissu. Si la sonde est marquée radioactivement, le signal d'hybridation sera détecté par autoradiographie. Comme l'illustre la **figure 8-(1)**, la sonde TH révèle très nettement la substance noire

Figure 8



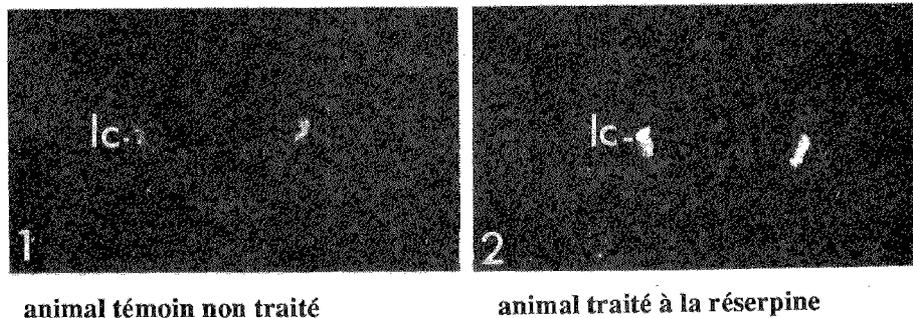
Cx = cortex
 Sn = substance noire
 Vta = aire segmentale ventrale

image contrôle

et l'aire segmentale ventrale sur une coupe de tissu appropriée. Un plus fort grossissement indique que seuls les corps cellulaires sont marqués ; l'immuno-histochimie révèle également les axones puisque l'enzyme est transportée le long de ces structures.

La comparaison des figures 9 (1 et 2) nous montre que l'hybridation *in situ* permet d'analyser la modulation de l'ARN messenger. Les coupes de tissu correspondant à la figure 9-2 ont été réalisées à partir de cerveaux de rats préalablement traités à la réserpine. Le signal est environ quatre fois plus intense que sur la coupe contrôle (9-1) confirmant ainsi les résultats obtenus par les dosages conventionnels effectués à partir de tissus. Il est maintenant possible d'effectuer cette analyse au niveau

Figure 9



Source : Jacques Mallet (Gif/Yvette)

cellulaire et de déterminer si toutes les cellules répondent de la même façon aux mêmes stimuli. Ainsi de nouvelles sous-populations de neurones devraient être caractérisées. L'hybridation *in situ* constituera un outil de choix pour effectuer des cartographies fonctionnelles et étudier les corrélations entre les modifications de l'activité neuronale et de l'activité génique.

Le gène TH humain

La possibilité d'appariement de deux brins d'ADN, même si leurs séquences ne révèlent qu'une identité partielle, a permis d'identifier les ADNc codant pour l'enzyme humaine, à partir de la sonde murine. De façon inattendue, cette étude a mis en évidence l'existence de quatre types d'ARN messagers qui diffèrent dans la partie 5' de leur séquence codante. Le premier HTH-1 est homologue à la séquence murine. Le deuxième et le troisième diffèrent par l'insertion à la même position de 12 ou 81 nucléotides respectivement. Le quatrième se caractérise, par la présence contiguë, des deux insertions. L'étude de l'ADN génomique correspondant montre sans ambiguïté que cette diversité résulte d'un épissage différentiel et d'un même ARN pré-messager tyrosine hydroxylase.

Ces quatre ARN messagers dirigent la synthèse d'enzymes qui diffèrent seulement dans leur partie N-terminale, qui, comme nous l'avons vu plus haut, joue un rôle régulateur. Si les quatre enzymes sont actives, leur activité spécifique varie d'une forme à l'autre : ainsi l'HTH₁ est trois fois plus active que l'HTH₂. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'épissage différentiel pouvait constituer un nouveau mode de régulation de l'activité TH. En effet un contrôle subtil de ce mécanisme peut changer le rapport de différentes formes, et par là même modifier le taux de neurotransmetteurs au niveau des différentes synapses. En d'autres termes l'épissage différentiel pourrait intervenir dans les processus d'adaptation des neurones aux modifications de l'environnement.

Ces connaissances fondamentales permettent d'approcher de manière originale certaines pathologies telles que la maladie de Parkinson. Cette affection résulte de la dégénérescence de neurones dopaminergiques au niveau de la substance noire. De façon surprenante, lorsque les troubles cliniques apparaissent, de l'ordre de 80% des cellules dopaminergiques ont déjà dégénéré. En fait, certaines études indiquent que les neurones non atteints synthétisent davantage de dopamine pour compenser la perte

neuronale. Parmi les hypothèse pouvant rendre compte de ce phénomène d'adaptation, figure celle d'une synthèse prépondérante de la forme HTH1 de l'enzyme humaine. Grâce à la possibilité de repérer des ARN messagers spécifiques à partir de coupes de tissus effectuées sur des cerveaux post-mortem, nous testons cette hypothèse par des expériences d'hybridation *in situ* avec des sondes qui reconnaissent spécifiquement les différentes formes d'ARN messenger TH humain.

Différents groupes étudient la possibilité de compenser la dégénérescence en cellules dopaminergiques par la greffe de cellules embryonnaires des médullo-surrénales. Toutefois ces études sont limitées par le type de cellule qu'il est possible de greffer. De nouvelles méthodes de la biologie moléculaire permettent maintenant de contourner ce problème : il est possible de faire exprimer dans pratiquement toute cellule capable de se diviser n'importe quel gène. Ainsi nous avons obtenu l'expression par plusieurs méthodes du gène de la tyrosine hydroxylase dans différents types de cellules, qui de plus libèrent la dopamine dans le milieu de culture. Ces études sont intéressantes à plus d'un titre. Il est maintenant possible par des systèmes modèles chez le rat, de greffer ces cellules au niveau du striatum et de tester leur capacité à compenser le déficit en cellules dopaminergiques. Dans un avenir assez proche cette méthodologie est amenée à se développer d'une manière importante, et pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques. Par ailleurs ces cellules modifiées constituent un outil précieux pour l'étude de la plasticité neuronale au cours du développement et chez l'adulte.

Tyrosine hydroxylase, le chromosome 11 et psychose maniaco-dépressive.

Diverses données pharmacologiques suggèrent que le système catécholaminergique est impliqué dans des maladies telles que la maniaco-dépression et la schizophrénie. Il est bien établi que certaines formes de ces affections ont une composante génétique. Il est donc maintenant, en principe, possible, d'identifier précisément le ou les défauts de structure de l'ADN responsable de ces maladies. La stratégie consiste tout d'abord à rechercher par la méthode de «linkage» ou liaisons génétiques, la région, à quelques millions de paires de bases près, où se situe cette anomalie. Cette méthode

est basée sur la recherche, dans les familles dites «informatives», de marqueurs génétiques qui co-ségrègent avec la maladie. Ces marqueurs positionnés sur l'ensemble des chromosomes correspondent à des variations de séquence nucléotidique d'un individu à un autre. Cette approche était appliquée en 1983 à l'étude de la chorée de Huntington dont le gène a été localisé dans une région particulière du chromosome 4. Le nombre de marqueurs identifiés augmente maintenant rapidement et en théorie 200 marqueurs répartis uniformément sur l'ensemble du génome humain devraient permettre de déterminer la région responsable de n'importe quelle affection génétique.

Pour les maladies psychiatriques et plus particulièrement la maniaque-dépression, il était dans un premier temps logique de s'intéresser à la tyrosine hydroxylase puisque cette enzyme constitue un excellent marqueur du système catécholaminergique. Le gène humain a été localisé au niveau de l'extrémité du bras court du chromosome 11, tout près des gènes de l'insuline et de l'oncogène Harvey-ras. Des résultats récents indiquent même que les gènes tyrosine hydroxylase et insuline sont contigus et ne sont séparés que par 2.700 paires de bases de séquence non-codante. D'autre part, plusieurs marqueurs caractéristiques de ces gènes ont été identifiés qui permettent de suivre la ségrégation des allèles correspondants d'une génération à l'autre.

Il est tout à fait remarquable que la première étude, effectuée à partir d'une famille Amish ait révélé une liaison entre le phénotype maniaque-dépressif et les gènes insuline et Harvey-ras. Dans cette famille l'anomalie se trouve donc au voisinage et peut être même au niveau du gène TH.

Il sera possible dans un proche avenir de localiser précisément le défaut génétique responsable de la maniaque-dépression associée au chromosome 11. Deux autres études concernant toujours la maniaque-dépression et effectuées sur d'autres familles ont montré une liaison avec des marqueurs situés sur le chromosome X. Enfin d'autres travaux n'ont pas confirmé les liaisons avec les chromosomes 11 et X. Ces résultats ne sont pas contradictoires mais révèlent simplement l'hétérogénéité de la maladie.

Des anomalies situées au niveau de différents gènes peuvent en effet conduire à des phénotypes identiques ou similaires.

L'identification des différentes altérations génétiques conduisant à cette affection permettra de classer de manière précise et de diagnostiquer les différentes formes de maniaque-dépression. Plus important encore, cette approche permettra d'élucider les mécanismes physio-pathologiques de la maladie et d'identifier ainsi de nouvelles cibles pharmacologiques. Dans un avenir relativement proche, de nouveaux traitements plus spécifiques seront mis au point et une prévention pourrait être même envisagée.

Il sera également possible d'analyser les gènes ainsi identifiés dans d'autres familles où le mode de transmission du même caractère est moins évident et d'apprécier ainsi le rôle d'autres facteurs dans l'étiologie de la maladie. Même si ces études ne font que commencer, il est clair que la génétique moléculaire est amenée à jouer un rôle de tout premier plan en psychiatrie biologique.

L'expression des gènes impliqués dans les maladies telles que la maniaque-dépression et la schizophrénie se révélera sans aucun doute être contrôlée de façon très étroite (comme pour la tyrosine hydroxylase) par l'activité neuronale. Ces études contribueront également à mieux comprendre comment l'environnement module l'expression des gènes. D'autres enzymes sont également étudiées dans notre laboratoire, en particulier celles qui contrôlent la synthèse de la noradrénaline, de la sérotonine, de l'acétylcholine, ou encore du GABA. Nous espérons ainsi élucider les différents modes de régulation qui contrôlent l'expression des neurotransmetteurs. Existe-t-il des mécanismes semblables, une même diversité d'un système à l'autre ? L'activité neuronale joue-t-elle le même rôle d'un système à l'autre ? Dans l'affirmative, les événements moléculaires qui établissent un lien entre ces modulations et l'expression génique sont-ils identiques ?

Enfin, indépendamment des affections qui peuvent résulter des anomalies génétiques au niveau de ces gènes, ces recherches devraient de manière plus générale ouvrir des perspectives dans l'analyse du comportement.

Jacques MALLET
Directeur de Recherche au CNRS