



CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Département Sciences de la vie

CONFÉRENCES JACQUES-MONOD

REGULATION OF PRE-mRNA SPLICING AND HUMAN DISEASE

REGULATION DE L'ÉPISSAGE DES PRE-ARNm ET MALADIES HUMAINES

President : **Reinhard LÜHRMANN**
M.P.I. for Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany

Vice-President : **Jamal TAZI**
Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-Université Montpellier II, France

Rapport de la conférence Juillet 2005

Renseignements administratifs

La conférence "Régulation de l'épissage des pré-ARNm et maladies humaines" a eu lieu à Aussois du 27 Avril au 1 Mai 2005. Elle a réuni 98 chercheurs de 13 pays et 81 laboratoires ou équipes :

- Allemagne (8 laboratoires)
- Belgique (2 laboratoires)
- Canada (5 laboratoires)
- Espagne (1 laboratoire)
- Etats-Unis d'Amérique (12 laboratoires)
- France (13 équipes généralement des UMR CNRS, 11 équipes INSERM, 4 équipes universitaires, 1 équipe CEA, 1 équipe du secteur privé)
- Israël (4 laboratoires)
- Italie (2 laboratoires)
- Norvège (2 laboratoires)
- Pologne (1 laboratoire)
- Royaume-Uni (7 laboratoires)
- Suède (4 laboratoires)
- Suisse (3 laboratoires)

Le nombre de conférenciers invités était de 29, soit un de moins que le nombre prévu dans le projet, à cause de l'indisponibilité de dernière minute de Joëlle Marie qui, pour des raisons de santé, n'a pas pu assister.

Cinq non invités ont pu présenter leurs travaux par voie orale, les autres ayant présenté des affiches. Deux séances d'affichage, de 2h minimum chacune, ont permis la présentation d'une trentaine d'affiches par séance.

Parmi les non invités, 24 étudiants en thèse et 21 chercheurs post-doctorants étaient présents à la conférence. Cette forte participation de jeunes chercheurs (46 % des participants) a été un souhait des organisateurs, afin de favoriser l'émergence de nouveaux chercheurs dans le domaine et favoriser les échanges entre laboratoires via les possibilités de collaborations et/ou échanges d'étudiants.

De l'avis de tous les participants, la conférence a été un très grand succès de tous points de vue. Ce succès a été possible grâce à la présence de personnes ayant une longue expérience dans le domaine avec des chercheurs qui sont au début de leur carrière et/ou venant d'horizons différents mais pour qui comprendre le

mécanisme d'épissage devient une nécessité pour la poursuite de leurs travaux. La réunion a permis la rencontre de chercheurs qui n'avaient sans doute pas l'occasion de se rencontrer dans des réunions plus recentrées, ou au contraire trop larges. La taille de la conférence est donc apparue comme optimale.

Cette forte interactivité a également été rendue possible grâce à la convivialité qui s'est rapidement installée dans la conférence, convivialité grandement due à la qualité de l'organisation pratique de la conférence. Le site d'Aussois a été hautement apprécié par tous, tant au niveau infrastructure qu'au niveau qualité des prestations. Le président et le vice-président tiennent ici à féliciter l'ensemble du personnel de la station pour leur efficacité et leur disponibilité. Plus particulièrement, il faut noter que le travail administratif et de coordination mené par Dominique Lidoreau a été d'une remarquable qualité et a grandement facilité le succès « social » de la conférence.

L'ensemble des conférenciers a également apprécié le temps de parole accordé à chaque communication orale et la discussion qui s'en est suivie ainsi que la durée globale de la conférence. Aucune critique majeure n'a été relevée à ce sujet et de ce point de vue la conférence s'est clairement distinguée des autres manifestations scientifiques de même calibre dans le domaine d'épissage.

Finalement, le succès de cette conférence a été concrétisé par le souhait massif des participants (100% des voix « pour ») de voir cette thématique renouvelée pour une prochaine Conférence Jacques Monod. Le vice-président 2005, Jamal Tazi, a accepté de faire une nouvelle proposition pour que dans deux ans s'organise une nouvelle conférence. Nous insistons sur la nécessité d'organiser cette manifestation en alternance avec celle du Cold Spring Harbor et qui réunit chaque année les spécialistes mondiaux de la maturation des pré-ARNm. La particularité de cette conférence a été de réunir autour d'une même table des scientifiques de haut niveau travaillant dans le domaine de l'épissage alternatif, des cliniciens et pour l'instant un industriel concernés par l'implication des processus d'épissage dans les pathologies humaines.

Résumé des conférences et discussions scientifiques

La conférence a rempli toutes ses promesses en réunissant les meilleurs spécialistes mondiaux dans le domaine afin de faire émerger de nouvelles idées sur les méthodes d'analyse des variants d'épissage dans les situations normales et pathologiques. La confrontation entre aspects mécanistiques de l'épissage et son implication dans la compréhension et le traitement des maladies génétiques chez l'homme a, en effet, engendré une large richesse de discussion.

Quatre thèmes ont été abordés au cours de cette conférence:

- . **Machinerie de l'épissage : facteurs protéiques et ribonucléoprotéiques**
- . **Epissage alternatif : mécanisme et relation avec d'autres processus cellulaires**
- . **Anomalies d'épissage dans les pathologies humaines : vers de nouvelles approches thérapeutiques**
- . **Analyse bioinformatique des variants d'épissage**

1) Machinerie de l'épissage : facteurs protéiques et ribonucléoprotéiques

La machinerie d'épissage des ARN pré-messagers nucléaires joue un rôle fondamental dans l'expression des gènes eucaryotes et tout particulièrement chez les vertébrés, où le nombre d'introns contenus dans la plupart des gènes de protéines est considérable.

Depuis la mise en place des systèmes d'épissage in vitro, il est admis que le spliceosome est une structure qui s'assemble de façon dynamique autour des sites d'épissage afin de permettre l'excision d'introns ayant des séquences différentes. Si les composants majeurs de cette structure ont été parfaitement caractérisés, beaucoup reste à faire pour comprendre les différentes étapes qui régissent l'assemblage du spliceosome. Dans ce cadre, les résultats présentés par l'équipe de R. Lührmann (Max-Planck-Institute, Göttingen) constituent une véritable avancée dans le domaine, dans la mesure où les complexes précédant le spliceosome mature ont pu être purifiés et leur composition protéique établie. De nombreuses techniques ont été mises en œuvre en conjonction avec ces méthodes de purification pour étudier finement les interactions protéine-protéine, protéine-ARN et ARN-ARN. S'agissant de complexes dynamiques, il n'est pas envisageable, pour le moment, d'en établir la structure par diffraction aux rayons X, néanmoins cette même équipe a

pu obtenir des structures 3D des complexes purifiés en utilisant la cryo-microscopie électronique sur particules isolées, ce qui sans aucun doute fournira un support intéressant pour la modélisation des interactions entre les différentes composantes du spliceosome.

La même technique a été utilisée par le groupe de R. Sperling (Department of Genetics, University of Jerusalem) pour établir la structure 3D de complexes isolés à partir de cellules en culture et qui correspondraient à des spliceosome pré-assemblés *in vivo*. Ce travail, bien qu'intéressant, soulève beaucoup de questions quant à l'identité des complexes purifiés et leur implication dans l'épissage des pré-ARNm et surtout remet totalement en question la notion de dynamique d'assemblage du spliceosome. En effet, ce groupe propose que les cinq snRNP majeures U1, U2, U4, U5 et U6 (particules formées de petits ARNs et de protéines) soient pré-assemblées dans le noyau des cellules et s'associent en une seule étape sur les transcrits naissants en cours de transcription. Cependant deux exposés qui ont concerné l'assemblage cotranscriptionnel de la machinerie d'épissage, tout d'abord chez la levure, puis dans les cellules de mammifères, se sont succédés dans la même session pour contredire ce modèle. Le premier émanant de l'équipe de Michael Rosbash ((Howard Hughes Medical Institute, Brandeis University) qui à l'aide d'expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP), a pu établir, chez *S. Cerevisiae*, qu'au cours de la transcription, la snRNP U1 est la première particule à contacter l'ARN et ce, de manière indépendante du site d'épissage 5'. L'utilisation de différents mutants d'épissage en cis a révélé que le point branchement joue un rôle crucial dans le recrutement de U1 et que son interaction ultérieure avec le site 5' entraîne une modification de la conformation de l'ARN qui est déterminante pour le recrutement de la snRNP U2 et de la tri snRNP U4/U5/U6. Ces travaux ont montré d'autre part que le recrutement des snRNP U2 et U5 conduit au départ de la snRNP U1 (Ce travail a été publié après la conférence dans *Mol Cell* 2005 : 19, 65-75).

Le second exposé par l'équipe de Karla Neugebauer (Max-Planck-Institute, Dresden) se servant du même type d'analyse a confirmé que les recrutements des snRNP U1, U2 et U5 sur l'ARN au cours de la transcription sont dissociables et, en particulier, que ceux de la snRNP U5 et de la protéine p19 interviennent après celui de U2. Ceci suggérant que les étapes catalytiques de l'épissage soient cotranscriptionnelles. Ces travaux ont également souligné que le complexe de liaison à la coiffe (CBC), en 5' des ARN, favorise le recrutement de U1 alors que son

absence bloque le recrutement de la snRNP U5 et le départ de U1. Ces observations supportent le modèle selon lequel le complexe CBC est impliqué dans le couplage entre assemblage de la machinerie d'épissage et transcription (Ce travail a été également publié après la conférence Mol Cell 2005 : 19, 53-63).

La conférence a été également l'occasion de compléter l'identification et la caractérisation de nombreux facteurs de la machinerie d'épissage. Citons à titre d'exemple l'excellent travail conduit par l'équipe de B. Séraphin (CGM/CNRS, Gif sur Yvette) qui a permis la caractérisation de nouveaux composants des particules U1 et U2 dont la structure est conservée de la levure à l'homme. Par d'élégantes analyses génétiques complétées par des expériences biochimiques, cette équipe est arrivée à la conclusion que certains composants du spliceosome, conservés phylogénétiquement, ont non seulement un rôle primordial dans l'épissage constitutif mais participent également à l'épissage alternatif. Ainsi, on peut penser que la machinerie d'épissage a évolué de façon à accommoder de nouvelles séquences introniques. Il n'est donc pas surprenant que certains composants du spliceosome ne soient pas absolument indispensables pour l'excision de tous les introns. Ceci n'est certainement pas le cas des trois sous unités du facteur d'épissage SF3a comme l'a clairement démontré l'équipe d'A. Krämer (Department of Cell Biology, University of Geneva). SF3a est, en effet, essentiel pour la formation de la particule 17S contenant le snRNA U2 et l'assemblage du spliceosome. Des expériences de déplétion par RNA interférence ont montré l'importance de chacune des trois sous unités pour la viabilité des cellules. Le knock-down des différentes sous unités provoque le blocage de l'épissage, suggérant ainsi que SF3a soit un facteur indispensable pour l'épissage de tous les introns. Ces travaux ont montré d'autre part que la déplétion de SF3a a des conséquences importantes sur plusieurs processus dans la cellule.

2) Epissage alternatif : mécanisme et relation avec d'autres processus cellulaires

Plusieurs exposés oraux ou par affiches ont souligné néanmoins, qu'il reste encore beaucoup à faire pour comprendre comment cette machinerie extrêmement complexe s'assemble de manière spécifique au niveau des sites d'épissage et catalyse l'élimination des introns. Plusieurs exposés ont été axés autour de la mise

en évidence de formes alternatives d'épissage des transcrits et, pour certains d'entre eux, à la recherche de facteurs cellulaires impliqués dans les choix alternatifs. Ces travaux ont révélé que la machinerie d'épissage est douée d'une grande flexibilité, et comporte à la fois des éléments communs à tous les sites d'épissage et d'autres spécifiques de certains d'entre eux, la combinatoire de ces différents éléments réalisant un véritable « code de l'épissage » permettant un choix régulé des épissages alternatifs.

Outre les jonctions intron-exon qui sont insuffisantes pour définir les sites d'épissage, ceux-ci requièrent des éléments supplémentaires de deux types : i) des éléments cis qui sont des séquences régulatrices activatrices ou inhibitrices et peuvent être localisées dans les exons aussi bien que dans les introns d'où quatre catégories : ESE et ESS d'une part (Exonic Splicing Enhancer et Exonic Splicing Silencer), ISE et ISS d'autre part (Intronic Splicing Enhancer et Intronic Splicing Silencer), ii) des facteurs trans capables de reconnaître ces séquences et qui seront donc soit des répresseurs soit des activateurs. Les facteurs protéiques répresseurs incluent des protéines liées aux hnRNP, tandis que les facteurs stimulateurs appartiennent à la famille des protéines SR. La caractérisation de ces facteurs et leur mode d'action ont fait l'objet d'excellents exposés par M. Garcia-Blanco (Duke University Medical Center), C. Smith (Department of Biochemistry, University of Cambridge), J. Stévenin (IGBMC CNRS-INSERM, Illkirch), D. Black (Howard Hughes Medical Institute, UCLA), B. Chabot (Faculté de Médecine et des Sciences de la santé, Université de Sherbrooke), S. Stamm (Institute for Biochemistry, University of Erlangen) et F. Baklouti (CNRS, Université Lyon 1). Le mode d'action de ces facteurs a été largement débattu au cours de la conférence et, pour la plupart, ces travaux ont été publiés cette année ou en 2004 (Sharma et al. Mol Cell 2005, 19, 485-496, Izquierdo et al. Mol Cell 2005, 19, 475-484, Wagner et al. J. Biol. Chem. 2005, 280, 14017-14027, Wollerton et al. Mol Cell 2004, 13, 91-100). Ne sont donc résumés ici que certains résultats ayant de nouvelles portées technologiques et/ou conceptuelles dans le domaine de l'épissage alternatif.

Tout d'abord le travail présenté par l'équipe de D. Rio (Department of Molecular and cell Biology, University of California Berkeley) qui, dans un le but d'étudier l'impact de la déplétion de certains facteurs comme ASF/SF2, B52/SRp55, hrp48 et PSI impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif chez la Drosophile, a développé des puces à ADN dédiées permettant d'apprécier les évènements

d'épissage alternatif de plusieurs gènes. Ces travaux ont permis d'établir que le nombre d'événements d'épissage contrôlés par chacun de ces facteurs est très variable : par exemple ASF/SF2 affecte fortement plus de 300 événements d'épissage, alors que PSI n'en affecte que 43. Afin d'identifier les cibles ARN de PSI et hrp48, cette équipe a purifié les messagers associés à chacune de ces protéines et les a utilisés comme sondes pour révéler les messagers cibles sur puces à ADN (travail publié après la conférence dans *Genes Dev* 2005, 1306-1314).

Dans la même optique, l'équipe de X. D. Fu (University California, San Diego) a utilisé le KO conditionnel chez la souris pour montrer que la déplétion de SF2/ASF affecte le développement normal du cœur. En analysant le transcriptome de ces souris, cette équipe a pu montrer que ASF/SF2 est impliqué dans la régulation de l'épissage alternatif des gènes qui sont exprimés d'une manière tissu-spécifique comme la troponine cardiaque T (cTnT) ou la kinase calmoduline-dépendante (CaMKII). Le niveau d'expression de SF2/ASF et sa phosphorylation apparaissent comme deux éléments clefs dans la régulation de l'épissage alternatif (travail publié dans *Cell* 2005, 120, 59-72).

Comme faits marquants de la conférence, on citera également plusieurs présentations soulevant l'interconnexion entre les événements d'épissage, la chromatine, la stabilité du génome, la transcription et la traduction. Tout d'abord l'exposé de D. Auboeuf (INSERM U685, Hôpital Saint Louis) qui a rappelé comment, en réponse à des hormones stéroïdiennes, les récepteurs correspondants peuvent altérer l'épissage alternatif en recrutant différents corégulateurs transcriptionnels sur le promoteur des gènes cibles de ces hormones. Parmi ces corégulateurs, certains sont apparentés à des régulateurs de l'épissage tels que les hnRNP dans le cas de TLS, CoAA et p54nrb, les protéines SR dans le cas de PGC-1 et CAPER ou les hélicases comme pour les facteurs p68 et p72 (Ces travaux publiés dans *Mol Cell* 2005, 17, 429-439 et dans *Science* 2002, 298, 416-419).

Dans le même ordre d'idée, l'exposé présenté par E. Batsché (Expression Génétique et Maladies, Institut Pasteur) a décrit l'implication du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF dans la régulation de l'épissage alternatif du gène CD44. Les travaux réalisés ont en effet montré que la surexpression du facteur Brm, la sous unité catalytique de certains complexes SWI/SNF, favorise l'inclusion d'exons alternatifs de CD44, et que Brm interagit avec le facteur PRP6 et le snRNA U5 après traitement des cellules par les esters de phorbol. Des expériences

d'immunoprécipitation de chromatine ont révélé que Brm est recruté au niveau des exons alternatifs après induction par le PMA. Dans le modèle proposé, Brm ralentirait la transcription par l'ARN Pol II au niveau des exons alternatifs de manière à permettre leur inclusion.

La présentation de J. Manley (Department of Biological Sciences, Columbia University) a marqué un nouveau tournant dans le domaine de l'épissage en décrivant un nouveau rôle de la protéine SR ASF/SF2 dans le maintien de la stabilité génétique. Les travaux de l'équipe de J. Manley ont en effet établi que la déplétion d'ASF/SF2 dans les cellules DT40 et HeLa entraîne l'apparition de cassures double-brin de l'ADN et la phosphorylation de l'histone H2AX. Dans le modèle proposé, ASF/SF2 empêcherait l'hybridation de l'ARN nouvellement transcrit avec le brin d'ADN complémentaire et l'apparition de structures « R-loop » mutagènes. Cette propriété n'est pas spécifique de ASF/SF2 puisque des résultats préliminaires suggèrent que la déplétion d'autres protéines SR comme SRp20 et SC35 induise également des cassures de l'ADN (Ce travail a été publié après la conférence dans *Cell* 2005, 122, 365-378).

L'implication de la protéine SR SF2/ASF dans les processus de traduction est aussi tout à fait surprenante et, à cet égard, la présentation de l'équipe de J. Caceres (MRC Human Genetics Unit, University of Edinburgh) a permis de faire le point sur les modules protéiques responsables de cette nouvelle activité. Cette équipe a montré que le domaine RS n'est pas important pour l'activation de la traduction, par contre le domaine RRM2 joue un rôle crucial dans ce processus (travail publié *Genes and Dev* 2004, 18, 755-768). L'idée que les protéines SR puissent jouer un rôle dans la traduction se trouve consolidée par les travaux de l'équipe d'A. Krainer (Cold Spring Harbor Laboratory) qui montrent que la surexpression de différentes protéines SR, et en particulier ASF/SF2, stimule fortement le processus de NMD (Nonsense Mediated Decay) impliqué dans la dégradation des ARN contenant un codon de terminaison de traduction précoce (PTC). Dans le cas de ASF/SF2, cette propriété ne requiert pas l'activité navette entre le noyau et le cytoplasme, mais nécessite le domaine C-terminal de la protéine (domaine RS). Dans la mesure où la surexpression d'ASF/SF2 n'entraîne pas une altération de l'épissage des facteurs impliqués dans le NMD, son rôle dans ce processus pourrait être de faciliter l'assemblage des complexes de jonction exon-exon (EJC), de modifier l'architecture

et / ou la localisation de l'ARN messenger, ou enfin d'en augmenter la traductibilité (travail publié Mol Cell 2004, 16, 597-607).

L'épissage alternatif est également au cœur de la régulation de l'expression de gènes viraux. En effet, le virus du SIDA, comme pratiquement tous les rétrovirus, a recours à l'épissage alternatif pour exprimer des gènes essentiels à sa multiplication. La version du virus qui s'intègre dans le génome des cellules humaines est transcrite sous forme d'un précurseur unique qui, par épissage alternatif, génère 40 ARN messagers codant pour des protéines virales différentes. Les travaux présentés par l'équipe de C. Branlant (MAEM/CNRS, Faculté des Sciences et Techniques de Nancy) ont permis d'établir que ces événements d'épissage sont contrôlés par plusieurs séquences régulatrices de type ESE et ESS dont certaines sont localisées en aval de sites d'épissage responsables de l'expression des protéines clefs de la multiplication virale comme Tat, Rev, Vpu, Env et Nef. C. Branlant a montré que l'utilisation de sites d'épissage 3' est sous le contrôle d'une compétition entre des protéines SR agissant de manière positive et de protéines type hnRNP A1 agissant de manière antagoniste aux protéines SR.

Les virus à ADN se servent également de l'épissage alternatif pour fabriquer des protéines essentielles à leur multiplication. Les travaux présentés par G. Akusjärvi (Department of Medical Biochemistry, Uppsala University) vont encore plus loin en démontrant que lors de l'infection, l'adénovirus détourne la machinerie d'épissage de la cellule hôte à son profit en rendant l'épissage des pré-ARN viraux ou cellulaires indépendant du facteur essentiel U2AF. Ce mécanisme implique non seulement les protéines SR dont l'état de phosphorylation change entre la phase précoce et la phase tardive d'infection, mais également certaines isoformes phosphorylées de la grande sous unité de la polymérase II, témoignant là encore des interconnexions entre les processus d'épissage et de transcription.

3) Anomalies d'épissage dans les pathologies humaines : vers de nouvelles approches thérapeutiques

La dégénérescence des sites d'épissage, indispensable à l'épissage alternatif, ne va pas sans inconvénients. Elle a en effet pour conséquence l'existence de nombreux sites cryptiques (en particulier dans les introns qui sont très longs) normalement trop faibles pour être utilisés de façon significative mais qui peuvent facilement accéder à la compétence à la faveur de simples mutations ponctuelles. A

l'inverse, ces mêmes mutations peuvent tout aussi bien inactiver des sites physiologiques. On observe d'ailleurs de plus en plus d'épissages aberrants à l'origine de maladies génétiques. Dans cette optique, il importe d'avoir présent à l'esprit que certaines de ces mutations, jusqu'alors considérées comme de simples polymorphismes car n'affectant pas la séquence codante, peuvent avoir en fait un retentissement profond donc pathologique sur la structure des protéines par le biais d'altérations de l'épissage. L'exposé de F. Baralle (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, University Trieste) a permis de faire le point sur l'étendue de ces altérations dans le cas de quatre gènes dont les mutations sont responsables de maladies chez l'homme, CFTR (Cystic Fibrosis), ATM (Ataxia Telangiectasia), CBS (Homocystinuria) et NF1 (Neurofibromatosis). La conclusion de ces travaux a été que les séquences qui régulent l'épissage alternatif sont des éléments clefs d'un nouveau code génétique, " le code de l'épissage ", agissant en amont du "code protéique". Des mutations qui touchent ces séquences sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques chez l'homme et l'analyse systématique des transcrits issus des gènes mutés reste le seul moyen d'identifier les séquences contribuant au "code de l'épissage". A ce sujet, J. Valcarcel (Centre of Genomic Regulation, University of Barcelona) a décrit un exemple concret de l'implication des altérations des profils d'épissage dans les pathologies humaines et montre que l'absence de l'inclusion de l'exon 6 dans l'ARNm du gène Fas est responsable d'une déficience en Lymphocytes T chez un patient. Le groupe de Juan Valcarcel a décrypté les mécanismes régulateurs qui conduisent à la décision d'inclure ou non cet exon alternatif dans l'ARNm Fas dans les situations physiologiques et dans la situation pathologique.

La dystrophie myotonique (DM) constitue un autre exemple de pathologie lié à des défauts de régulation de l'épissage alternatif. L'équipe de T. Cooper (Baylor College of Medicine, Houston), qui travaille depuis plusieurs années sur l'origine de cette pathologie, a montré que les expansions de séquences microsatellites de type CTG ou CCTG, directement impliquées dans le développement de la maladie, sont des sites de fixation de deux facteurs d'épissage à effet antagoniste la protéine CUG-BP et CELF.

Face à l'augmentation croissante des données fournies par le corps médical, le groupe de M. Claustres, et plus particulièrement C. Bérout (Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Montpellier), a entrepris de créer une base de données

regroupant toutes les données médicales et biologiques de nombreux patients français atteints de maladies génétiques causées par des mutations génomiques responsables d'altérations de profils d'épissage alternatif. En plus de cette base de données, C. Bérout a développé divers logiciels permettant le traitement des données collectées, en intégrant des algorithmes de prédiction de séquences ESE, ESS et du point de branchement qui sont souvent la cible de mutations chez les patients. Ces outils constituent une passerelle essentielle permettant le rapprochement entre la recherche fondamentale et le diagnostic médical en fournissant de nombreux modèles d'étude qui permettent de développer de nouvelles thérapies.

A cet égard, plusieurs laboratoires se sont investis dans l'exploitation des connaissances sur le mécanisme d'épissage alternatif comme moyen pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une première stratégie consiste à cibler les facteurs qui s'associent aux séquences régulatrices d'épissage, notamment lorsque celles-ci sont mutées et entraînent des défauts d'épissage alternatif. Dans cette optique, le groupe de J. Tazi (IGMM/CNRS, Université de Montpellier II) a sélectionné des molécules chimiques qui inhibent spécifiquement l'activité de plusieurs protéines SR qui sont des facteurs d'épissage reconnaissant des éléments cis activateurs d'épissage. Des expériences *in vitro* et *ex vivo* ont montré que ces molécules permettent de corriger des événements d'épissage aberrants causés par des mutations dans des séquences activatrices d'épissage mais également d'inhiber l'expression de gènes viraux épissés, ainsi que la réplication de virus tels que le VIH. Ces molécules ouvrent la voie pour le développement de traitements anti-tumoraux, anti-viraux ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques qui ciblent l'activité des facteurs d'épissage particuliers impliqués dans des maladies génétiques (travaux publiés dans PNAS 2005, 102, 8764-8769, Mol Pharm 2005, 67, 1186-1194).

Une stratégie alternative, développée au sein de l'équipe de L. Garcia (Généthon, Evry), a pour objectif de cibler les séquences cis régulatrices d'épissage au lieu des facteurs d'épissage qui se lient sur ces éléments régulateurs. Dans le cas de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), des mutations responsables de l'apparition de codon STOP prématurés dans l'ARNm du gène de la dystrophine aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle responsable de la pathologie. Chez certains patients atteints de DMD, il existe un mécanisme naturel

qui favorise l'exclusion des exons qui contiennent un codon stop prématuré et entraîne la synthèse d'une protéine partiellement tronquée qui conserve une partie de son activité, autorisant l'apparition de fibres révertantes fonctionnelles. Le groupe de L. Garcia s'est inspiré de ce processus naturel et a développé une technologie permettant d'exprimer des petits ARN associés à des snARN, à partir de vecteurs AAV, qui favorisent l'exclusion d'exons contenant des codon STOP prématurés. Le traitement de souris mdx, un modèle murin de Dystrophie Musculaire, avec ces vecteurs AAV a permis de rétablir un niveau d'expression stable d'une protéine dystrophine fonctionnelle équivalent à 50-80 % du niveau d'expression normal sur plusieurs mois (Travail publié dans Science 306, 1796-1799). Cet outil est maintenant en cours d'adaptation pour traiter des patients DMD. Les résultats obtenus sur un modèle canin atteint de DMD sont en fait très encourageants.

Dans une stratégie alternative aux anti-sens traditionnels, l'équipe de B. Chabot (Université de Sherbrooke) a développé des oligonucléotides bifonctionnels dont une partie s'hybride à l'ARN cible, l'autre permettant l'ancrage d'un facteur d'épissage susceptible de corriger le défaut d'épissage. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour forcer l'extinction de l'expression de certaines isoformes du gène CD44 associées à la progression tumorale. La combinaison de cette technique avec l'ARN interférence a permis à ce groupe l'obtention de résultats très prometteurs dans le traitement de certains cancers.

4) Analyse bioinformatique des variants d'épissage

Parallèlement au développement d'outils thérapeutiques, ces deux dernières années ont vu l'émergence d'une nouvelle technologie, basée sur l'approche des puces à ADN, qui permet l'analyse à grande échelle d'évènements d'épissage alternatif pour de nombreux gènes. Le groupe de B. Blencowe (Department of Molecular and Medical Genetics, University of Toronto) a développé une plateforme d'analyses post-génomiques basée sur cette technologie. Ces puces « épissage » constituent un outil très performant pour étudier les variations de profil d'épissage alternatif entre un tissu sain et un tissu cancéreux et pour identifier des altérations d'épissage caractéristiques des cellules cancéreuses. Cette technologie devrait massivement contribuer au développement de nouveaux outils de diagnostic et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour les traitements anticancéreux. Dans le même temps, la société ExonHit a développé un système d'étude similaire

basé sur la même technologie qui permet l'analyse des profils d'expression de variants d'épissage de nombreux gènes humains appartenants aux familles des protéines G couplées aux récepteurs membranaires et aux canaux ioniques. L. Bracco (vice président de cette société) a eu l'occasion de présenter les services que peut offrir ExonHit à la communauté de l'épissage.

Un nouvel enjeu des études actuellement menées dans le domaine de l'épissage vise à établir le degré d'évolution des mécanismes d'épissage alternatif pour des gènes conservés entre diverses espèces eucaryotes. Pour aborder cette problématique, deux approches complémentaires ont été envisagées. La première stratégie, développée dans le laboratoire de B. Blencowe, est basée sur l'utilisation des puces « épissage » qui permettent de comparer des évènements d'épissage précis pour un grand nombre de gènes conservés entre la souris et l'Homme. La deuxième stratégie, mise en place au sein de l'équipe de C. Burge (MIT, Department of Biology, Cambridge), repose sur le développement et l'utilisation d'outils bioinformatiques et de bases de données rassemblant les EST connus pour ces deux espèces. Ces deux équipes ont pu estimer la proportion d'évènements d'épissage alternatif propres à chaque espèce et celle des évènements conservés entre l'homme et la souris.

En parallèle de ces deux études, le groupe de G. Ast (Department of Human Genetics and Molecular Medicine, Tel Aviv University) s'intéresse aux mécanismes qui sont à l'origine de l'apparition du processus d'épissage alternatif chez les eucaryotes pluricellulaires, en prenant comme origine le processus d'épissage constitutif chez les eucaryotes unicellulaires. L'équipe de G. Ast a montré, grâce à des études comparatives entre différents organismes eucaryotes, que l'apparition de gènes contenant de multiples introns a été accompagnée de la modification des sites d'épissage donneurs. En effet, au cours de l'évolution, la conservation des séquences introniques des sites 5' d'épissage a diminué, alors que dans le même temps la partie exonique de ces sites était plus conservée. Cette évolution dans la séquence des sites donneurs a conduit à une plus grande plasticité dans la reconnaissance des sites d'épissage, condition sine qua non à l'apparition du mécanisme d'épissage alternatif.