

> L'épissage des pré-ARN messagers constitue une étape obligatoire pour la très grande majorité des transcrits primaires chez les eucaryotes. Il est sujet à de nombreuses variantes, ou épissages alternatifs, qui permettent l'assemblage de transcrits codant pour des protéines requises de manière transitoire ou traduisant une adaptation pathologique. Cette diversification du réservoir de transcrits augmente sensiblement la variabilité protéique. L'identification de mutations dans les séquences nécessaires à l'épissage ou à son contrôle a permis de déterminer les modifications d'épissage en relation avec le développement de maladies héréditaires ou cancéreuses. Rapidement, des approches ont été développées pour tenter de contourner de façon expérimentale l'effet de ces mutations, afin de restaurer un niveau d'épissage suffisant à une compensation fonctionnelle efficace. Les espoirs suscités par ces nouvelles approches méritent que l'on en prenne toute la dimension et que les perspectives thérapeutiques qu'elles offrent soient évaluées. <

Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire

Laurent Corcos, Stéphanie Solier



S. Solier: Inserm U.517, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon; Hématologie clinique, CHRU Le Bocage, 2, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France.

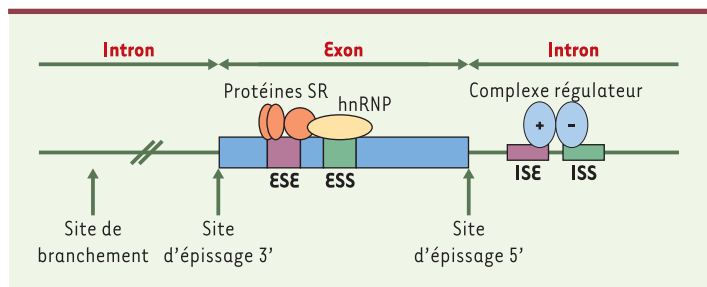
L. Corcos: Inserm U.613, Faculté de Médecine, 22, avenue Camille Desmoulins, 29238 Brest Cedex 3, France. laurent.corcos@univ-brest.fr

avec sept protéines Sm ou apparentées et quelques autres protéines spécifiques [1]. Le spliceosome a deux fonctions: la reconnaissance des sites d'épissage et les étapes couplées d'élimination des introns et de re-ligation des exons. Plusieurs familles de protéines jouent un rôle majeur parmi lesquelles les protéines SR (riches en sérines et en arginines), hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleo-proteins*) et CELF (*CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors*) [2] (Figure 2). Un répertoire de séquences *cis* joue également un rôle déterminant lors de l'épissage [3] (Figure 2).

En 2004, environ 9,5% des mutations répertoriées dans HGMD (*human gene mutation database*) affecteraient l'épissage (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/docs/hohoho.html>). Les mutations de type I couvrent environ 60% des mutations et touchent des séquences de sites d'épissage invariantes, ce qui abolit complètement la phase de définition de l'exon [4]. Les mutations de type II touchent les motifs variables. Dans le cas de la maladie de Menkes (défaut d'absorption hépatique du cuivre), une mutation d'un motif invariant du site donneur de l'exon 6 conduit à une forme très sévère, tandis qu'une délétion de 3 paires de bases (pb)

L'épissage des pré-ARN messagers concerne au moins 95% des transcrits et constitue un préalable à l'exportation des messagers matures dans le cytoplasme, siège de la synthèse protéique. Il s'effectue de façon coordonnée avec la transcription et se déroule en deux étapes successives impliquant deux réactions de *trans*-estérification. Trois déterminants de séquence sont requis (Figure 1A): les sites d'épissage 5' (site donneur) et 3' (site accepteur) situés aux jonctions exon-intron, respectivement en 5' et 3' de l'intron, et le site de branchement en amont du site 3' accepteur. Cette réaction (Figure 1B) a lieu au sein du spliceosome, un complexe dont l'assemblage et le fonctionnement requièrent plus de 150 polypeptides et cinq ribonucléoprotéines, les snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*), constituées d'une molécule d'ARN, l'ARNsn (*snRNA*), complexée

Figure 2. Schéma positionnant les principales protéines sur le pré-ARNm, ainsi que les séquences en cis les plus déterminantes pour la réaction d'épissage. La fonction des protéines SR (*serine-rich*) (représentées en orange) peut être réglée au niveau transcriptionnel, en fonction du tissu ou du stade de développement, par épissage alternatif, par phosphorylation-déphosphorylation, ce qui influence leur localisation subcellulaire et leur activité [45]. Elles sont stockées dans des compartiments du noyau appelés *speckles* ou SFC (*splicing factors compartments*) [46]. Elles doivent être recrutées par le complexe d'épissage et dirigées à la périphérie des SFC vers les sites de transcription. Une fois engagées dans le splicéosome, elles sont les cibles de phosphatases Ser/Thr, PP1, PP2A, PP2Cγ, dont certaines font partie intégrante du splicéosome [47]. Les protéines hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) (représentées en jaune) figurent parmi les protéines les plus abondantes du noyau; certaines d'entre elles sont confinées dans le nucléoplasme (hnRNP C et U), tandis que d'autres (hnRNP A, B, K, J) font la navette entre le noyau et le cytoplasme [48]. L'ESE (*exonic splicing enhancer*) (représenté en violet au niveau de l'exon) est le siège de nombreuses mutations qui modifient le site de liaison de protéines SR et conduisent à l'exclusion d'exon. Dans le cas de la myopathie de Becker, la mutation non-sens Glu1211X, touchant un ESE, conduit à une manifestation morbide modérée, tandis que la plupart des autres mutations non-sens entraînent la production de protéines tronquées, à l'origine d'un phénotype très sévère. Un algorithme de prédiction d'ESE fonctionnels est disponible en ligne (<http://exon.cshl.edu/ESE/index.html>). L'ESS (*exonic splicing silencer*) (représenté en vert au niveau de l'exon) agit, entres autres, par liaison à hnRNP I (ou PTB) et hnRNP A/B ou H. hnRNP A1 peut également induire la répression par liaison à un site exonique et par le recrutement coopératif d'autres hnRNP, ce qui neutralise l'activité d'enhancers proximaux, voire l'assemblage du splicéosome. L'ISE (*intronic splicing enhancer*) et l'ISS (*intronic splicing silencer*) (représentés respectivement en violet ou en vert au niveau de l'intron) auraient des rôles antagonistes, lesquels peuvent s'exercer au sein d'éléments introniques bipartites.



Mutations en cis	Maladie	Fonction de la protéine sauvage	Numéro OMIM*
PBGD	Porphyrie intermittente aiguë	Synthèse de l'hème	17600
BRCA1	Cancer du sein et de l'ovaire	Prolifération cellulaire, composant de l'ARN pol II	113705
PMM2	Syndrome de Jaeken	Synthèse de GDP-mannose	212065
CFTR	Fibrose kystique	Canal chlore	602421
Lysyl-hydroxylase	Syndrome de Ehlers-Danlos du collagène	Formation d'hydroxylsines	153454
FANCG	Anémie de Fanconi	Réparation de l'ADN	227650
HPRT	Syndrome de Lesch-Nyhan	Métabolisme de l'ADN	308000
Pyruvate déshydrogénase E1α	Encéphalomyélopathie de Leigh	Métabolisme du pyruvate	312170
Fibrilline-1	Syndrome de Marfan	Constituant des microfibrilles	134797
NF1	Neurofibromatose de type 1	Inhibiteur de la voie Ras	162200
OCT	Hyperammoniémie	Cycle de l'urée	300461
UPC	Porphyrie cutanée	Métabolisme des porphyrines	176000
Hexosaminidase	Maladie de Sandhoff	Métabolisme des gangliosides	606869
Adénosine désaminase	Immunodéficience combinée sévère	Métabolisme de l'adénosine	102700
FAH	Tyrosinémie de type 1	Métabolisme de la tyrosine	276700

Tableau 1. Exemples de gènes portant des mutations d'épissage associées à des maladies chez l'homme (adapté de [13]). * OMIM: *online Mendelian inheritance in man* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

du motif variable du même site donneur d'épissage conduit à une exclusion de l'exon 6 dans une fraction des transcrits et est associée à une forme moins agressive. Une mutation unique dans le dernier nucléotide de l'exon 18 du gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), associée à la mucoviscidose, crée un site cryptique conduisant à l'inclusion d'un nouvel exon de 84 pb. Le niveau de sévérité des atteintes pulmonaire et de l'épididyme est corrélé au taux d'inclusion de cet exon aberrant.

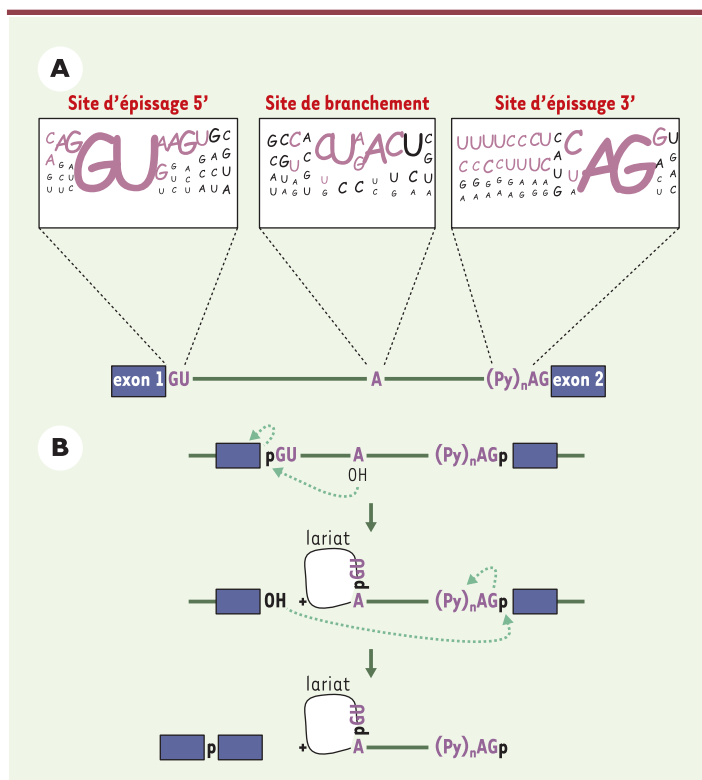


Figure 1. Épissage des pré-ARN messagers. **A.** Profil des séquences consensus au site d'épissage 5', au site de branchement et au site d'épissage 3'. À chaque position, la fréquence des 4 nucléotides A, C, G et T est représentée par la taille des caractères. La fréquence a été déterminée à partir de 1 683 séquences humaines [44]. Les séquences les plus conservées sont les dinucléotides GU et AG, respectivement en 5' et en 3' de l'intron, et le nucléotide A au niveau du site de branchement. Les rectangles représentent les exons, et les traits pleins les introns. (Py)_n: étendue de polypyrimidines. **B.** Réaction d'excision-épissage d'un pré-ARNm. L'épissage d'ARN pré-messager se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de *trans*-estérification. Trois éléments sont essentiels à ces réactions: les sites d'épissage 5' (ou site donneur) et 3' (ou site accepteur), situés à la jonction exon-intron, respectivement en 5' et 3' de l'intron, et le site de branchement, en amont du site 3' accepteur. Lors de la première étape, le groupement 2' hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du site d'épissage 5'. Cette réaction engendre un exon 5' libre et un *lariat* intermédiaire. Lors de la deuxième étape, le 3' hydroxyle de l'exon 5' attaque le phosphate du site d'épissage 3', produisant ainsi l'ARNm et le *lariat* d'intron.

Épissage alternatif

On estime que 10 000 à 20 000 des gènes humains sont sujets à un épissage alternatif (EA) [5, 6]. L'analyse de représentativité de fragments de transcrits au sein des banques d'EST (*expressed sequence tags*) montre, en effet, que chaque ARN pré-messager peut faire l'objet, en moyenne, de six à huit épissages distincts, et cela pour l'ensemble des eucaryotes analysés. En outre, une analyse, avec les banques d'EST, de 475 séquences protéiques variantes retrouvées chez des sujets porteurs de maladies suggère qu'au moins un tiers de ces protéines est issu d'un épissage alternatif [7]. Des données récentes indiquent que 70 % à 88 % des événements d'EA changeraient la nature de la protéine, et seulement 19 % conduiraient à la production de protéines tronquées [8]. Cette dernière observation résulte en grande partie du fait que l'EA est souvent associé à l'insertion de codons stop prématurés (situés en amont de la position occupée par le codon stop habituellement utilisé), ce qui peut être à l'origine de la production de protéines tronquées, mais surtout du mécanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* [9]. Ce mécanisme est en effet très souvent observé si le codon stop est situé à plus de 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon, et conduit à diminuer considérablement la stabilité des transcrits correspondants, donnant ainsi rarement lieu à la synthèse d'une protéine abondante. Ce mécanisme souffre de peu d'exceptions et est interprété comme une surveillance physiologique destinée à prévenir la production de protéines tronquées potentiellement délétères. Enfin, l'épissage alternatif peut être influencé par la transcription [10, 11]. Les différents types d'EA sont illustrés sur la Figure 3.

L'analyse de maladies d'origine génétique a été longtemps focalisée sur la recherche de mutations affectant la région codante des protéines. Plus récemment, un très large ensemble de mutations régulatrices a été répertorié. Ces mutations sont associées à la production de transcrits moins abondants, aberrants ou nouveaux, codant ou non pour des protéines normales ou modifiées. La majorité des mutations morbides touchent davantage les séquences de régulation que les régions codantes [2, 12, 13] et affectent également des protéines d'épissage [14] (Tableaux I et II).

Identification des événements d'épissage alternatif

Une étape déterminante dans la compréhension des mécanismes et du rôle de l'EA tient à l'identification, *in*

extenso, des événements d'épissage. Des algorithmes spécifiques ont été développés et plusieurs approches expérimentales à haut débit ont été explorées (Figure 4). L'utilisation de sondes oligonucléotidiques fixées sur des filtres de forte densité a permis l'hybridation d'ARNm à des taux reflétant la spécificité tissulaire d'expression des gènes cibles [15]. Des méthodes plus sophistiquées utilisant des fibres optiques ont également été proposées [16]. D'autres méthodes destinées à identifier l'ensemble des transcrits alternatifs d'un gène donné ont été également rapportées [17, 18]. Un ensemble de sites web dédiés à l'EA est listé par L.F. Larreau *et al.* [19].

Exemples de maladies dues à des défauts d'épissage

Maladies d'origine génétique

La démence frontotemporale et le parkinsonisme liés au chromosome 17 sont dus à des mutations du gène *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*) codant pour la protéine tau requise pour l'assemblage des microtubules. Des événements d'EA touchant les exons 2, 3 et 10 conduisent à la production d'isoformes aux extrémités amino- et carboxyterminales variables. Le rapport des isoformes de tau 4R (présence de l'exon 10)/3R (absence de l'exon 10) est déterminant pour spécifier le phénotype (il est d'environ 1 dans le cerveau normal); ce rapport est étroitement contrôlé par l'activité d'un ensemble de séquences ESE (*exonic splicing enhancer*), ESS (*exonic splicing silencer*), ISS (*intronic splicing silencer*) et une structure en épingle qui piège le site 5' d'épissage.

Les amyotrophies spinales (*spinal muscular atrophy*, SMA) sont dues à des mutations du gène *SMN* (*survival motoneuron*, SMN1). Quatre-vingt-treize pour cent des patients sont porteurs d'une délétion homozygote qui emporte au moins l'exon 7, le reste des patients ayant une délétion hétérozygote avec présence sur l'autre allèle d'une mutation non-sens ou faux-sens. Ce gène est dupliqué, et une copie très homologue (SMNc ou SMN2) est présente chez 95% de la population [3].

Le type 2 de la dystrophie myotonique est dû à une expansion de séquences CCTG dans l'intron 1 du gène *ZNF9*. C'est la longueur, dans l'ARN, du nombre de répétitions de CUG ou CCUG qui spécifie le degré de l'atteinte. Ces expansions de séquences seraient responsables d'une perte de l'activité d'épissage due à l'activation de la liaison spécifique de protéines des familles mbn1 (*muscleblind*) sur ces séquences, conduisant à un phénomène de séquestration de ces protéines sur ces sites. Un phénotype comparable est d'ailleurs obtenu chez des souris dont le gène *mbn1* a été invalidé. Ce recrutement protéique incorrect conduirait à des épissages aberrants de plusieurs

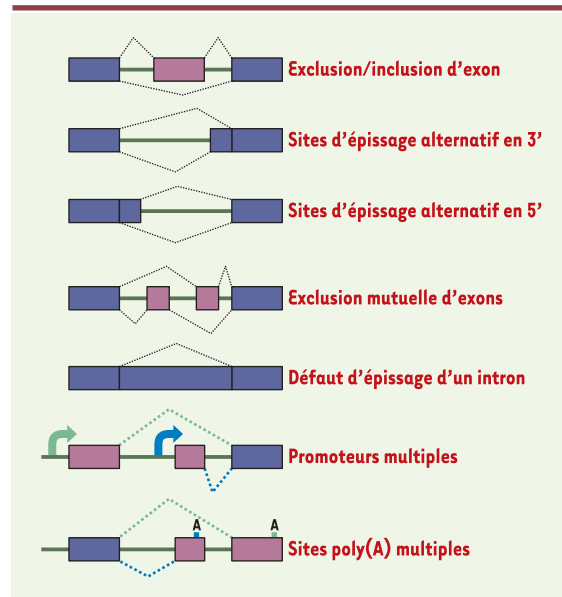


Figure 3. Représentation des différents types d'épissage alternatif. En bleu les exons constitutifs, en violet les exons alternatifs, et en traits pleins les introns. Différentes combinaisons d'assemblage des exons, voire de rétention d'intron sont possibles. En outre, l'utilisation de promoteurs transcriptionnels peut dicter le choix d'épissage. Enfin, l'épissage alternatif peut conduire à l'utilisation de signaux de sites de polyadénylation distincts.

transcrits dont la troponine T cardiaque, le récepteur de l'insuline, le canal chlore spécifique du muscle, la protéine tau et une protéine apparentée à la myotubularine.

Protéine d'épissage	Maladie	Numéro OMIM
CUGBP1, -2	Dystrophie myotonique	601074, 602538
FUSIP1	Leucémie, sarcomes	605221
FUS-TLS	Liposarcome, leucémie aiguë myéloblastique	137070
GSK-3β	Alzheimer	605004
HMGAlα	Alzheimer	600701
MBNL1, -2, -3	Dystrophie myotonique	606516, 607237, 300413
NOVA1	Syndrome paranéoplasique	602157
PRPF3, -8, -31	Rétinite pigmentaire	607301, 606419, 607300
RBM1A1	Azoospermie	400006
HCC1	Carcinome hépatocellulaire	604739
SFPQ	Carcinome papillaire rénal	605199
SMN1, -2	Atrophie musculaire spinale	600354, 601627
TP73L	Syndrome de Hay-Wells	603273

Tableau II. Exemples de gènes de protéines d'épissage impliquées dans des maladies chez l'homme (adapté de [14]).

Des mutations inactivant l'assemblage ou la fonction des snRNP ont également été trouvées. Dans le cas de la rétinite pigmentaire, trois gènes codant pour des protéines du spliceosome, responsables de formes autosomiques dominantes, ont été identifiés (PRPF31, HPRP3 et PRPC8). Les mutations de PRPF31 incluent des insertions, des délétions, des mutations faux-sens et des mutations de sites d'épissage. La protéine correspondante est associée aux snRNP U4/U6 et U5 dont elle permet la trimérisation. La protéine HPRP3 est également un composant du complexe U4/U6 snRNP, au sein duquel

elle serait capable de recruter HPRP4. Les mutations d'HPRP3 associées à des cas sporadiques de la maladie sont faux-sens ou non-sens dans deux codons conservés de l'exon 11. La protéine PRPC8 est également un constituant du spliceosome et le siège d'un ensemble de mutations toutes regroupées dans une région très conservée du dernier exon.

Modifications d'épissage associées à la tumorigenèse

Plusieurs observations ont permis d'associer des modifications d'épissage à la tumorigenèse [3]. D'une part, l'abondance relative de protéines SR augmente entre les stades préneoplasique et métastatique dans un modèle de tumorigenèse mammaire chez la souris [20]. D'autre part, la transition, par augmentation de l'épissage alternatif, d'une forme de faible affinité vers une forme de forte affinité du récepteur 1 du FGF (*fibroblast growth factor*), est associée à la progression tumorale des astrocytomes [21]. Cet EA est favorisé en présence de la protéine PTB (*polypyrimidine tract binding protein*) dont le taux est augmenté. Le gène *CD44* est impliqué dans l'adhérence et la migration cellulaires et peut coder pour des formes variantes de CD44, CD44v, associées à de nombreux cancers [22]. Le gène suppresseur de tumeur *BRCA1* code pour une protéine nucléaire, mais, dans certains cancers du sein, un variant d'épissage dépourvu de l'exon 11 code pour une protéine dépourvue de signal de localisation nucléaire, suggérant la possibilité d'une perte de fonction de la protéine [23].

Compensations moléculaires

La meilleure compréhension des mécanismes de l'EA et l'identification des transcrits qu'il produit ont permis de développer des stratégies visant à modifier le taux de transcrits alternatifs, pour favoriser la synthèse de protéines « thérapeutiques » ou bloquer la production de protéines « indésirables » [14, 24].

Surexpression de protéines stimulant l'épissage

Les surexpressions de hnRNP A1 et du facteur d'épissage adénoviral E4-ORF6 permettent l'exclusion de l'exon 18 inséré dans un minigène *CFTR*, conduisant à une surproduction de transcrits normaux dépourvus de l'exon 18 [25]. La surexpression du facteur d'épissage Htra2-b1 permet une surproduction de transcrits normaux (incluant l'exon 7) du gène *SMN2*, de nature à compléter le défaut chez les patients SMA porteurs d'allèles délétères du gène *SMN1* [26]. Les protéines SC35 et hnRNP A1 ont des effets opposés sur l'inclusion de l'exon 9 dans un minigène *Casp-2* et sur l'induction de l'apoptose [27].

Modification d'activité des protéines d'épissage

L'inhibition pharmacologique de la kinase Clk1/Sty, qui phosphoryle les protéines SR et augmente l'activité de la protéine d'épissage ASF/SF2 (*alternative splicing factor/splicing factor 2*), modifie l'activité d'épissage de transcrits sélectionnés [28]. Des composés synthétiques de type PNA (*peptide nucleic acid*) sont capables de recruter la machinerie d'épissage [29], et le butyrate ou le valproate de sodium

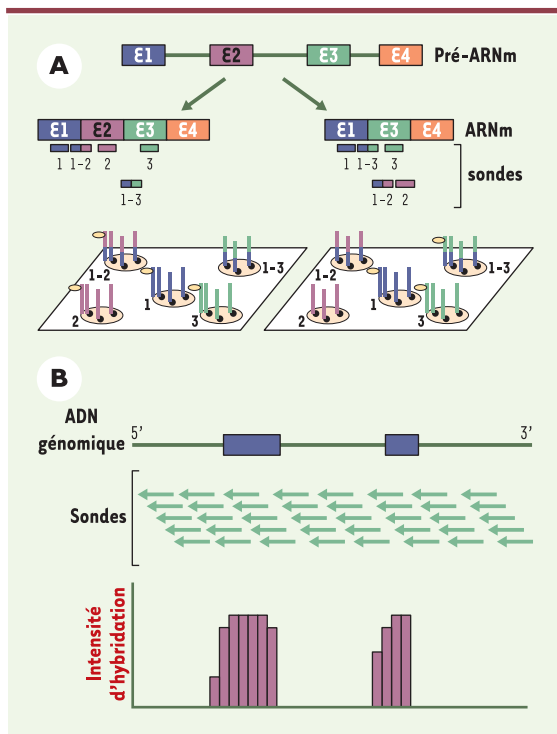


Figure 4. Identification des événements d'épissage alternatif.

A. Utilisation de sondes oligonucléotidiques fixées sur des filtres à forte densité. Dans cet exemple, le pré-ARNm contient 4 exons, dont un exon alternatif (E2 en violet). Cinq types de sondes sont utilisées : 1, 2, 3, 1-2, 1-3 (par exemple, la sonde 1 s'hybride au niveau de l'exon 1, la sonde 1-2 s'hybride au niveau de la jonction entre exon 1 et exon 2...). Les sondes oligonucléotidiques sont fixées sur des filtres par leur région 3' (symbolisée par un rond noir). Les ARN ou les produits de RT-PCR marqués sont ensuite hybridés sur ces filtres. L'ARN qui contient les exons 1, 2 et 3 s'est hybridé avec les sondes 1, 2, 3, et 1-2, tandis que l'ARN ne contenant pas l'exon 2 s'est hybridé avec les sondes 1, 3, et 1-3. L'hybridation est représentée par le petit ovale jaune. **B.** Hybridation moléculaire. À partir d'ADN génomique, une série de sondes (flèches vertes) est produite. Elles sont ensuite hybridées avec des populations d'ARNm ou d'ADN complémentaire. L'hybridation n'a lieu qu'avec les séquences exoniques (adapté de [15]).

induisent une augmentation du taux des transcrits SMN2, aboutissant à une rémission partielle dans un modèle murin d'atrophie musculaire spinale caractérisée par une perte d'expression, en rapport avec une mutation, du gène *SMN1* [30]. L'aclarubicine, un inhibiteur de la topo-isomérase II, induit une redistribution des protéines SR, ce qui stimule également l'inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2* [31]. Des inhibiteurs des topo-isomérases I (camptothécine) et II (étoposide) induisent l'ÉA (en faveur de l'inclusion de l'exon 9) du pré-ARNm codant pour la pro-caspase-2 [32, 33]. En outre, les hormones stéroïdiennes stimulent également l'ÉA par l'intermédiaire du recrutement de *trans*activateurs spécifiques [34].

Blocage ou facilitation d'épissage avec des oligonucléotides

Des oligonucléotides destinés à inhiber l'inclusion de l'exon 23 muté du gène de la dystrophine dans le modèle murin des souris *mdx* (porteuses d'une mutation non-sens dans l'exon 23 du gène de la dystrophine, aboutissant à une protéine tronquée qui ne peut se localiser correctement au niveau du sarcolemme des fibres musculaires) permettent la synthèse et la localisation correctes de la dystrophine [35]. Récemment, une restauration phénotypique complète de fonction de la dystrophine a été obtenue chez ces souris, après injection de virus AAV (*adeno-associated virus*), permettant la production d'un transcrit élaboré de façon à induire l'exclusion de l'exon 23 porteur de la mutation et correspondant à une région répliquée non essentielle à la fonction de la protéine [36]. Des oligonucléotides antisens bifonctionnels, couvrant un domaine de ciblage couplé à une partie peptidique (PNA) contenant des ESE constituées de répétitions arginine-sérine, ont été utilisés [37, 38]. Le ciblage des transcrits BRCA1 et SMN2 par la méthode ESSENCE (*exon-specific splicing enhancement by small chimeric effectors*) a été réalisé avec succès [38]. Une variante de cette méthode, TOES (*targeted oligonucleotide enhancer of splicing*), consistant en l'inclusion d'un domaine effecteur contenant une séquence cible de fixation de protéines d'épissage comme ASF/SF2, a permis le traitement de fibroblastes de patients SMA, avec un degré de correction (inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2*) de l'ordre de 70% [14]. Une approche similaire a été réalisée avec un oligonucléotide bifonctionnel capable de recruter la protéine hnRNP A1 et d'augmenter le rapport transcrits Bcl-xS/transcrits Bcl-xL, dans le but de promouvoir le potentiel proapoptotique [39] (Figure 5). L'interférence par l'ARN s'est également montrée efficace [40].

Le *trans*-épissage

Cette approche, appelée SMART (*spliceosome-mediated RNA trans-splicing*), repose sur le ciblage des pré-ARNm [14] (Figure 6). Elle a permis la correction du saignement, associé à la production de facteur VIII, dans un modèle de souris hémophiles [41]. Le *trans*-épissage a été également utilisé pour cibler des transcrits matures avec des ribozymes de groupe I [42]. Une troisième approche repose sur l'utilisation d'une endonucléase d'épissage des ARNt. L'endonucléase permet le clivage de l'ARN cible et de l'ARN correcteur apporté, avant que les

étapes de *cis*- et de *trans*-épissage ne se déroulent. L'expression de l'endonucléase et de la séquence de ciblage a permis de reprogrammer un gène cellulaire dans des fibroblastes de souris [43].

À la lumière de ces différentes approches, il est concevable d'imaginer des combinaisons entre ces stratégies: par exemple, le cumul d'agents pharmacologiques agissant sur le taux ou l'activité des protéines SR et topo-isomérases avec des expériences de *trans*-épissage. La sélection forcée de promoteurs transcriptionnels, par l'utilisation de ligands de récepteurs nucléaires, pourrait également constituer une approche prometteuse permettant de diriger des épissages alternatifs spécifiques [34].

Conclusions

Outre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles, la recherche systématique des événements d'ÉA pourrait permettre d'obtenir des canevas de référence quant au caractère prédictif potentiel, par exemple, d'un état précancéreux, ou de l'efficacité d'un traitement. Les possibilités nouvelles évoquées par les succès expérimentaux récents de compensation fonctionnelle suscitent de réels espoirs thérapeutiques. Les difficultés prévisibles appartiennent au registre des étapes requises pour le développement de

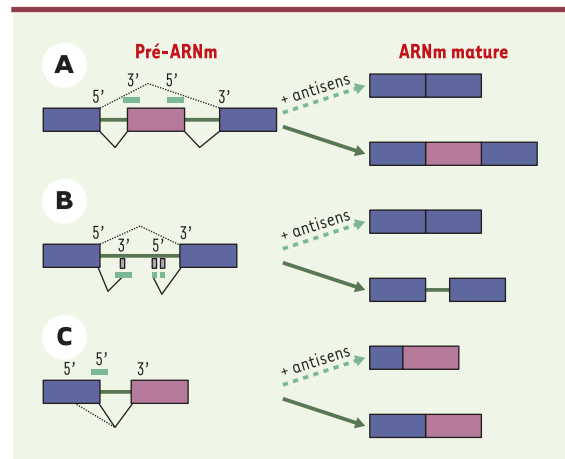


Figure 5. Blocage ou facilitation d'épissage avec des oligonucléotides dirigés contre des motifs d'épissage. Les oligonucléotides antisens sont représentés en vert. Ils permettent l'exclusion d'un exon (A), bloquent les sites cryptiques d'épissage 5' ou 3' aberrants (B), forcent la sélection d'un site d'épissage 5' particulier (C). En bleu les exons constitutifs, en violet les exons alternatifs, en traits pleins les introns (exemples des gènes β -globine et *CFTR* [49], du gène *DMD* [50] et du gène *Bcl-X* [51]) (adapté de [49]).

GLOSSAIRE

Splicéosome : complexe multiprotéique constitué de plus de 150 polypeptides et de cinq ribonucléoprotéines (*small nuclear ribonucleoproteins*), elles-mêmes constituées d'une molécule d'ARN, l'ARNsn (*snRNA*), formant un complexe avec plusieurs protéines.

Protéines SR : protéines du splicéosome riches en résidus arginine et sérine en position carboxyterminale, et contenant un ou deux domaines de liaison à l'ARN (RRM, *RNA recognition motif*) en position aminoterminale.

hnRNP : *heterogenous nuclear ribonucleoproteins*. Constitutives du splicéosome, elles forment des complexes multiprotéiques associés aux ARNsn. Elles ont une structure modulaire permettant leur interaction avec l'ARN et d'autres hnRNP.

Protéines CELF : *CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors*, possèdent un domaine de liaison à l'ARN et sont impliquées dans le contrôle de l'épissage alternatif et spécifique de tissu.

ESE : *exonic splicing enhancer*, sites de liaison des protéines SR. Une fois fixées, celles-ci peuvent promouvoir la phase de définition de l'exon en recrutant la machinerie d'épissage par leur domaine SR.

ESS : *exonic splicing silencer*, sites fréquemment retrouvés dans des introns et agissant vraisemblablement par liaison à des répresseurs de la famille des hnRNP.

ISE : *intronic splicing enhancer*, peuvent stimuler l'étape de définition de l'exon et activer des exons « faibles » ou cryptiques.

ISS : *intronic splicing silencers*, inhibent la phase de définition de l'exon en recrutant des répresseurs capables de se lier aux sites d'épissage ou aux sites proximaux.

médicaments. À celles-ci, s'ajoutent les obstacles inhérents aux approches de thérapie génique et cellulaire en termes d'efficacité, de «durabilité», et surtout d'innocuité à long terme. De plus, les « niches » constituées par les maladies génétiques rares risquent de représenter une priorité toute relative pour l'industrie pharmaceutique. En revanche, tous les intervenants en santé humaine seront sans aucun doute très motivés par le défi de l'élaboration de molécules à visée anticancéreuse. C'est probablement dans ce domaine que les attentes seront les plus nombreuses et les plus difficiles à satisfaire. ♦

control, has permitted to determine the causes of qualitative or quantitative variations in transcript levels associated with inherited diseases or cancer development. A number of molecular approaches have been undertaken to try to compensate for the effect of deleterious splicing mutations and to restore, at least in part, sufficient amounts of either the normal or a surrogate transcript. These include overexpression of splicing proteins, improvement of their activity by post-translational modification, splice-site increased or decreased usage, and RNA-mediated *trans*-splicing. Using such approaches, phenotypic improvements have been obtained in animal models, carrying new hopes for the development of therapeutic strategies aimed at correcting both inherited and acquired diseases that involve pre-mRNA splicing defects. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Dr Jamal Tazi (CNRS, Montpellier) pour sa lecture du manuscrit. Merci également pour leur soutien à l'Inserm, la Ligue Nationale contre le Cancer, la Ligue contre le Cancer de Saône-et-Loire et le Conseil régional de Bourgogne.

SUMMARY

Alternative mRNA splicing, pathology and molecular therapeutics

Pre-mRNA splicing operates towards at least 95% of the transcript pool. It is subjected to a large number of variations, collectively regrouped under the term of alternative mRNA splicing, which occurs, on average, 6 to 8 times per pre-mRNA molecule. Consequently, many more proteins may be encoded from a single gene, which may satisfy a physiological need, or mark a pathological adaptation. The identification of mutations in sequences required for splicing, both constitutive and alternative, or for their

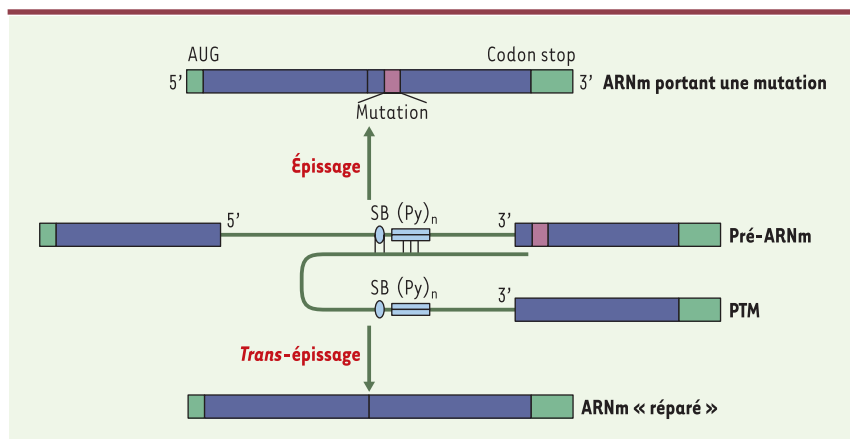


Figure 6. Le trans-épissage. Dans cet exemple, le pré-ARNm comprend deux exons, et porte une mutation (représentée en violet) dans le deuxième exon, conduisant à une protéine non fonctionnelle. L'utilisation de PTM (*pre-trans-splicing molecule*) permet la suppression de la mutation en remplaçant l'exon muté. Le PTM se lie au pré-ARNm par appariement de séquences, ce qui masque en partie le site 3' d'épissage. La réaction d'épissage normale est donc bloquée et le domaine de *trans*-épissage du PTM peut jouer le rôle d'un site 3' d'épissage. Le PTM apporte l'exon dépourvu de mutation, ce qui permet la réparation de l'ARNm et la production d'une protéine fonctionnelle. (Py)_n: étendue de polypyrimidines, SB: site de branchement.

RÉFÉRENCES

1. Nilsen TW. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 2003; 25: 1147-9.
2. Caceres JF, Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet* 2002; 18: 186-93.
3. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003; 17: 419-37.
4. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18: 123-7.
5. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 291-336.
6. Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C. Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 2850-9.
7. Hanke J, Brett D, Zastrow I, et al. Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends Genet* 1999; 15: 389-90.
8. Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 2002; 30: 13-9.
9. Nagy E, Maquat LE. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 198-9.
10. Proudfoot N. Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 290-3.
11. Logette E, Wotawa A, Solier S, et al. The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene* 2003; 22: 935-46.
12. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 285-98.
13. Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers *Clin Biochem* 2004; 37: 584-94.
14. Garcia-Blanco MA, Baraniak AP, Lasda EL. Alternative splicing in disease and therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 535-46.
15. Roberts GC, Smith CW. Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6: 375-83.
16. Yeakley JM, Fan JB, Doucet D, et al. Profiling alternative splicing on fiber-optic arrays. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 353-8.
17. Zhu J, Shendure J, Mitra RD, Church GM. Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing. *Science* 2003; 301: 836-8.
18. Jin P, Fu GK, Wilson AD, et al. PCR isolation and cloning of novel splice variant mRNAs from known drug target genes. *Genomics* 2004; 83: 566-71.
19. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 273-82.
20. Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM. Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis. *Oncogene* 1999; 18: 3574-8.
21. Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Morrison RS. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 484-8.
22. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51: 191-200.
23. Thakur S, Zhang HB, Peng Y, et al. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 444-52.
24. Nissim-Rafinia M, Kerem B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 2002; 18: 123-7.
25. Nissim-Rafinia M, Chiba-Falek O, Sharon G, et al. Cellular and viral splicing factors can modify the splicing pattern of CFTR transcripts carrying splicing mutations. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1771-8.
26. Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, et al. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9618-23.
27. Wu JY, Tang H, Havlioglu N. Alternative pre-mRNA splicing and regulation of programmed cell death. *Prog Mol Subcell Biol* 2003; 31: 153-85.
28. Pilch B, Allemand E, Facompre M, et al. Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer Res* 2001; 61: 6876-84.
29. Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 120-5.
30. Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, et al. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9808-13.
31. Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, et al. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2841-9.
32. Wotawa A, Solier S, Logette E, et al. Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 181-9.
33. Solier S, Lansiaux A, Logette E, et al. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 53-61.
34. Aubæuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW. Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 2002; 298: 416-9.
35. Lu QL, Mann CJ, Lou F, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003; 9: 1009-14.
36. Goyenville A, Vulin A, Fougousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004; 306: 1746-9.
37. Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, et al. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a *trans*-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4114-9.
38. Cartegni L, Krainer AR. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 120-5.
39. Villemaire J, Dion I, Elela SA, Chabot B. Reprogramming alternative pre-messenger RNA splicing through the use of protein-binding antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 2003; 278: 50031-9.
40. Celotto AM, Graveley BR. Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA* 2002; 8: 718-24.
41. Chao H, Mansfield SG, Bartel RC, et al. Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing. *Nat Med* 2003; 9: 1015-9.
42. Rogers CS, Vanoye CG, Sullenger BA, George AL Jr. Functional repair of a mutant chloride channel using a *trans*-splicing ribozyme. *J Clin Invest* 2002; 110: 1783-9.
43. Deidda G, Rossi N, Tocchini-Valentini GP. An archaeal endoribonuclease catalyzes *cis*- and *trans*- nonspliceosomal splicing in mouse cells. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1499-504.
44. Burge CB, Tuschl T, Sharp PA. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF, eds. *The RNA world II*. Cold Spring Harbor-New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 525-60.
45. Sanford JR, Bruzick JP. Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity. *Genes Dev* 1999; 13: 1513-8.
46. Mistelli T, Spector DL. The cellular organization of gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 323-31.
47. Murray MV. Role of phosphorylation in pre-mRNA splicing. *Front Horm Res* 1999; 25: 83-100.
48. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993; 63: 289-321.
49. Sazani P, Kole R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* 2003; 112: 481-6.
50. Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, et al. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 42-7.
51. Mercatante DR, Mohler JL, Kole R. Cellular response to an antisense-mediated shift of Bcl-x pre-mRNA splicing and antineoplastic agents. *J Biol Chem* 2002; 277: 49374-82.

TIRÉS À PART

L. Corcos