

Syndrome de DiGeorge : énigme résolue ?

Dans cette maladie relativement fréquente du développement embryonnaire qu'est le syndrome de DiGeorge, les principales malformations observées chez le nouveau-né concernent le cœur et les vaisseaux efférents ainsi que le thymus et les glandes parathyroïdes. Une fente palatine et une dysmorphie faciale complètent souvent un tableau clinique variable qu'une grande quantité de travaux expérimentaux ont attribué à une anomalie de développement impliquant la crête neurale dans la région embryonnaire des poches pharyngées.

On le sait depuis plus de 10 ans, la majorité des malades syndromiques présentent une grande délétion du bras long du chromosome 22. Tous les gènes emportés par la délétion sont ainsi réduits à une seule copie. Le clonage positionnel de ces gènes, puis le séquençage systématique de toute la région génomique concernée ont pendant des années laissé espérer l'identification rapide du ou des gène(s) coupable(s), mais les frustrations n'ont pas manqué. Par exemple, le clonage de points de cassure chromosomique chez des malades typiques présentant une translocation du chromosome 22 plutôt qu'une délétion ne révéla aucun gène responsable. Faisant le point sur la question à l'été 1999 (*m/s* 1999, n° 8-9, p. 999), et tout en rappelant combien la souris avait des façons diverses de produire un syndrome de type DiGeorge, nous placions des espoirs dans *UFD1L*, un gène aux caractéristiques troublantes dans la région critique du chromosome 22 : d'une part, son expression était placée sous le contrôle de facteurs de transcription jouant un rôle majeur dans la morphogenèse cardiaque, d'autre part, il était délété (partiellement) chez un nouveau-né atteint d'un syndrome de DiGeorge typique.

Néanmoins, il s'agissait d'un cas unique qui ne reçut pas de confirmation ultérieure.

Profitant de ce que l'organisation des gènes de la région critique du chromosome 22q humain était largement conservée sur le chromosome 16 de la souris, plusieurs équipes, prenant le taureau par les cornes, avaient entrepris d'obtenir chez ce rongeur des délétions de grande taille dans l'espoir de reproduire du même coup un phénotype de type DiGeorge [1, 2]. C'est ainsi que l'équipe d'Antonio Baldini, au Texas, rapportait fin 1999 que des anomalies cardiovasculaires typiques du syndrome apparaissaient chez des embryons de souris rendus hémizygotes pour plus d'une quinzaine de gènes contigus [1]. Les anomalies observées étaient attribuées à un développement défectueux des artères du quatrième arc aortique. A l'état homozygote, cette délétion d'environ 1,5Mb créée par ingénierie chromosomique semblait incompatible avec une embryogenèse menée à son terme puisque parmi les souriceaux analysés à la naissance, aucun n'était homozygote pour la délétion.

Poursuivant ce travail remarquable, la même équipe a créé d'autres délétions, de taille plus restreinte et se chevauchant partiellement. Comme elle le rapporte aujourd'hui, à nouveau dans *Nature* [3], le même phénotype cardiovasculaire a pu être reproduit par délétion d'un segment chromosomique d'environ 200 kb. Ces chercheurs ont ensuite produit, par transgenèse, des souris porteuses de chromosomes artificiels contenant divers fragments génomiques de la région 22q explorée. Le croisement de ces souris transgéniques avec les souris déficientes a permis d'identifier un fragment de 140kb comportant quatre gènes dont la présence

chez les souris délétées prévient l'apparition des anomalies cardiovasculaires. Les deux derniers gènes ont pu être écartés rapidement car l'invalidation de l'un - *Cdcre11* - n'avait pas produit de phénotype, même à l'état homozygote, tandis que l'autre, *Gplbβ*, était déjà connu pour son rôle causal dans une pathologie des plaquettes, le syndrome de Bernard-Soulier.

Les profils d'expression embryonnaire des deux autres gènes étaient aussi connus. Celui de *Gnb11* n'était pas évocateur. *Tbx1* (*T-Box*), au contraire, avait été rapporté dès 1996 comme étant exprimé dans la région des arcs et des poches pharyngées embryonnaires [4]. L'analyse détaillée de l'expression des messagers *Tbx1*, effectuée par Lindsay et coll., montre en particulier une expression forte à proximité des artères des arcs pharyngés au stade de développement - 10,5 jours embryonnaires - critique pour la formation des organes affectés chez les malades [3]. A noter que le gène n'est pas exprimé dans les cellules de crête neurale à destinée cardiaque. Enfin, les auteurs de cet article rapportent que l'expression hétérozygote d'une mutation créée dans le gène *Tbx1* produit, comme la délétion, une anomalie de développement des artères de la région de la quatrième poche pharyngée. Ils en concluent que dans cette région du génome, la réduction à une seule dose du gène *TBX1* pourrait suffire à rendre compte des diverses anomalies de la circulation artérielle conotruncale observées chez les malades. La mutation homozygote du gène *Tbx1* produit chez la souris des anomalies supplémentaires puisque le développement des troisième, quatrième et sixième poches pharyngées est complètement perturbé. Cependant, les embryons doublement

mutés pour *Tbx1* restent viables [3], ce qui suggère l'existence d'un effet délétère supplémentaire de la délétion décrite en 1999 [1].

Quel crédit peut-on prêter à la désignation du gène *TBX1* humain comme un gène d'haploinsuffisance impliqué dans le syndrome de DiGeorge? Deux autres articles lui attribuant un rôle au moins partiel, une certaine confiance semble de rigueur. Le premier de ces deux articles, paru dans *Cell*, résulte d'une approche tout à fait similaire menée chez la souris par Raju Kucherlapati et ses collaborateurs [5]. Comme leurs concurrents, ces auteurs ont préparé une délétion hétérozygote de grande taille qui englobait entièrement celle de l'équipe de Baldini. Le phénotype obtenu à l'état hétérozygote montrait diverses anomalies conotroncales réminiscentes de celles observées chez les malades. S'ils n'avaient pas d'anomalies décelables de la thyroïde ou du thymus, une grande majorité de souriceaux hétérozygotes montraient en revanche une absence totale de glande parathyroïde, défaut qui corrobore une des composantes du syndrome de DiGeorge mais qui n'a pas été observé dans l'étude précédente. La délétion d'environ 1,5 Mb englobait 24 gènes contigus, réduits ensuite à un fragment d'environ 1 Mb contenant 10 gènes identifiés. Une triple dose génique obtenue par la production de souris transgéniques pour quatre de ces gènes, parmi lesquels *Tbx1*, produisit des anomalies cardiovasculaires similaires à celles provoquées par la délétion, suggérant un effet de dosage génique. En outre, une légère hypoplasie thymique fut également observée chez quelques souriceaux. En revanche, les glandes parathyroïdes étaient normales [5]. Enfin, ces auteurs ont eux aussi obtenu un gène *Tbx1* muté et produit des souris n'ayant plus qu'une copie du gène sauvage. A nouveau, des malformations de la région conotroncale compatibles avec celles observées chez les malades atteints de syndrome de DiGeorge ont été observées, mais sans être accompagnées d'aucune autre des anomalies associées au syndrome.

m/s n° 8-9, vol. 17, août-septembre 2001

Un troisième article associant *TBX1* et syndrome de DiGeorge vient d'être publié dans *Nature Genetics* [6]. L'équipe de Virginia Papaioannou s'intéresse depuis plusieurs années à une famille de facteurs de transcription qui partagent un domaine protéique de liaison à l'ADN appelé boîte T, initialement décrit dans le produit du gène *Brachyury* au locus T de la souris [7]. Il est rapidement apparu que les premiers gènes de souris identifiés contenant cette boîte T s'exprimaient de façon très contrôlée et spécifique au cours du développement embryonnaire [4]. Chez l'homme, deux gènes de la famille, *TBX3* et *TBX5*, ont été respectivement associés à deux syndromes d'haploinsuffisance, de transmission autosomique dominante et de pénétrance variable : les syndromes de Schinzel et de Holt-Oram (*m/s* 1997, n° 4, p. 576). Du fait de sa présence dans la région 22q11 délétée, *TBX1* apparaissait donc comme un gène particulièrement important à analyser. L'étude parue dans *Nature Genetics* confirme que des embryons de souris ne possédant qu'un allèle sauvage de *Tbx1* ont des anomalies des artères du quatrième arc aortique. De façon intéressante, la pénétrance de ces anomalies varie selon le fond génétique des souris explorées. Les auteurs n'ont pas retrouvé de souriceaux nouveau-nés *Tbx1*^{-/-} vivants ; ils meurent probablement en fin de gestation. Peu avant terme, ces embryons sans allèle sauvage du gène *Tbx1* présentent des malformations des oreilles, de la face et du cou, et une absence quasi-constante de thymus et de glande parathyroïde qui s'ajoutent aux anomalies cardiovasculaires déjà notées [6].

De ces trois études américaines, menées de façon systématique pour deux d'entre elles, de façon plus ciblée pour la troisième, nous pouvons raisonnablement conclure que le gène *TBX1* joue un rôle clé probable dans la genèse des anomalies conotroncales observées chez les malades atteints de syndrome de DiGeorge. Les autres anomalies du syndrome peuvent-elles être aussi liées à une insuffisance de production de la protéine *Tbx1*? Certes, il est possible que les effets de seuil

soient différents chez l'homme et chez la souris, expliquant que des effets produits chez le rongeur par l'invalidation des deux copies du gène *Tbx1* puissent résulter d'une simple réduction de dose génique chez l'homme. La variabilité des phénotypes observés par l'équipe de Papaioannou chez des souris de fond génétique différent suggère également que d'autres facteurs génétiques puissent moduler l'intensité des défauts de développement dus à une haploinsuffisance de *TBX1*. Il reste néanmoins que, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, aucune mutation ponctuelle de *TBX1* n'a été retrouvée chez plusieurs dizaines de malades syndromiques testés, typiques dans leur présentation clinique, mais sans délétion chromosomique détectée. Également perturbantes à cet égard sont les observations publiées depuis plusieurs années de malades dont les délétions en 22q11, atypiques, n'englobent pas le gène *TBX1*.

Un autre article paru dans ce même numéro de mars 2001 de *Nature Genetics* ajoute encore une pièce au puzzle. Guris *et al.* ont analysé l'effet chez la souris de l'inactivation du gène *Crkol*, dont l'homologue humain *CRKL* fait également partie du fragment en 22q11 communément délété chez les malades atteints de syndrome de DiGeorge. *Crkol* code pour une protéine impliquée dans la transmission de signaux de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Comme *Tbx1*, *Crkol* est exprimé dans la région des poches et des arcs pharyngés, mais son expression s'étend au tube neural et à des dérivés de la crête neurale dans la région pharyngée [8]. L'inactivation d'une copie de *Crkol* semble sans conséquence. En revanche, seuls quelques souriceaux *Crkol*^{-/-} arrivent à terme, la plupart mourant dans la dernière partie de la gestation avec des malformations du septum interventriculaire et des vaisseaux efférents. Une partie de ces embryons montrent en outre des malformations du thymus et des glandes parathyroïdes, ainsi que de certains dérivés nerveux de la crête neurale qui pourraient rendre compte d'anomalies observées de façon inconstante

chez certains des patients ayant une délétion de l'un de leurs chromosomes 22q [8].

Pour résumer, il semble bien qu'une partie du voile soit aujourd'hui levée avec l'identification d'un premier gène – *Tbx1* – dont l'homologue humain est localisé dans la région critique du chromosome 22q et dont la réduction à une seule dose reproduit chez la souris une partie du syndrome de DiGeorge. Cependant, une certaine confusion règne encore, plusieurs autres gènes de la région restent suspects à un titre ou à un autre. Gageons que cette pathologie néonatale n'a pas fini de stimuler l'imagination et les efforts des chercheurs.

1. Lindsay EA, Botta A, Jurecic V, *et al.* Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature* 1999; 401: 379-83.
2. Kimber WL, Hsieh P, Hirotsune S, *et al.* Deletion of 150 kb in the minimal DiGeorge/velocardiofacial syndrome critical region in mouse. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 2229-37.
3. Lindsay E, Vitelli F, Su H, *et al.* *Tbx1* haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 2001; 410: 97-101.
4. Chapman DL, Garvey N, Hancock S, *et al.* Expression of the T-box family genes, *Tbx1-Tbx5*, during early mouse development. *Dev Dyn* 1996; 206: 379-90.
5. Merscher S, Funke B, Epstein JA, *et al.* *TBX1* is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell* 2001; 104: 619-29.
6. Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, *Tbx1*. *Nat Genet* 2001; 27: 286-91.

7. Papaioannou VE. The T-box gene family. *BioEssays* 1998; 20: 9-19.

8. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene *CRKL* phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nat Genet* 2001; 27: 293-8.

Marc Lipinski

Cnrs UMR 1598, Interactions moléculaires et cancer, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Le microarray « fonctionnel » ou comment faire face à la surabondance de gènes.** Après les puces pour l'analyse du profil transcriptionnel et protéique, voici la puce « fonctionnelle » pour l'analyse de la fonction des gènes. Elle évitera peut-être l'asphyxie du biologiste cellulaire menacé de passer le restant de ses jours à surexprimer ou invalider, un à un, une multitude de gènes. Le principe consiste à déposer sur une lame de multiples spots, chacun correspondant à un ADN plasmidique, et emprisonné dans une couche de gélatine, de façon à éviter sa dispersion aux cellules adjacentes. La lame est ensuite incubée en présence d'un agent lipidique facilitant la transfection, puis des cellules adhérentes sont déposées sur la lame, et celle-ci est incubée dans du milieu de culture pendant 2-3 jours. Les cellules effectuent 2-3 cycles de divisions au cours desquels elles vont être trans-

fectées par l'ADNc au contact duquel elles poussent. Chaque spot contient environ 30-80 cellules et l'altération détectable de la fonction ou du phénotype cellulaire reflétera la fonction du gène transfecté. Les auteurs ont testé la validité de cette approche en déposant sur lame de l'ADNc codant pour la GFP, puis en co-transfectant deux plasmides. L'exercice suivant, plus difficile, consistait à transfecter des plasmides codant pour FKBP12-Myc, cible du FK506, un puissant immunosuppresseur. Les seules cellules capables de fixer FK506 exprimaient effectivement FKBP12, et aucun faux positif n'était détecté. Les auteurs montrent que l'on peut ainsi détecter, au sein d'ADNc inconnus, étiquetés avec un épitope détectable, ceux qui codent pour une protéine de signalisation, un substrat phosphorylé (qui sera révélé par l'application d'un anticorps anti-phosphotyrosine), un

intermédiaire sur la voie de l'apoptose. Dans ce dernier cas, c'est la morphologie cellulaire ou l'application d'une réaction TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end-labelling reaction*), qui révèlent le processus apoptotique. On peut aussi révéler la localisation intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, du produit d'un ADNc ainsi transfecté, ce qui peut donner des indications sur sa fonction. La principale difficulté de cette approche réside dans la construction des ADNc qui doivent être complets, mais ces collections sont en cours de construction. A en croire les auteurs, on peut déposer sur une lame environ 6 à 10 000 spots et, en quelques lames, déposer l'ensemble des ADNc du génome. Les 35 heures deviendraient-elles accessibles aux chercheurs?

[1. Ziauddin J, Sabatini DM. *Nature* 2001; 411: 107-10.]