

## Délétions héritées et de novo de la région 5q13 dans les amyotrophies spinales infantiles

Les amyotrophies spinales infantiles (*spinal muscular atrophy*, SMA) sont des maladies neuromusculaires caractérisées par une dégénérescence des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière. Il en résulte un déficit moteur avec atrophie musculaire. Ce sont les maladies héréditaires récessives autosomiques fatales les plus fréquentes après la mucoviscidose [1]. L'anomalie biochimique responsable de ces affections est inconnue. Selon les critères cliniques (âge de début des symptômes et évolutivité) retenus par le Consortium international sur les SMA [2], on distingue trois types de

SMA: le type I (forme aiguë, maladie de Werdnig-Hoffmann), le type II (forme intermédiaire) et le type III (forme modérée, maladie de Kugelberg-Welander). Le gène responsable des trois formes de la maladie a été localisé dans la région chromosomique 5q11.2-q13.3 [3-6].

Récemment, le gène responsable des SMA a été localisé dans un intervalle de 2 cM, soit environ 2.10<sup>6</sup> pb, défini par les *loci* flanquants D5S629 et D5S637 [7]. En combinant les approches physique et génétique, nous avons construit un *contig* de chromosomes artificiels de levure (YAC) couvrant cet intervalle à

partir duquel nous avons pu isoler 28 nouveaux marqueurs d'ADN (*figure 1*). Parmi eux, neuf étaient aussi localisés sur le bras court du chromosome 5, démontrant l'existence d'une duplication partielle de la région 5q13 sur le chromosome 5p. Par ailleurs, d'autres marqueurs microsatellites reconnaissent deux *loci* [C212 (D5F149S1 et S2)], [C272 (D5F150S1 et S2)], voire trois *loci* [C161 (D5F153S1, S2 et S3)] dans la région 5q13. Ce sont ces marqueurs qui détectent les *loci* les plus proches du *locus* SMA. Ainsi, le ou les gènes impliqués dans les SMA se trouvent-ils localisés dans une région caractérisée

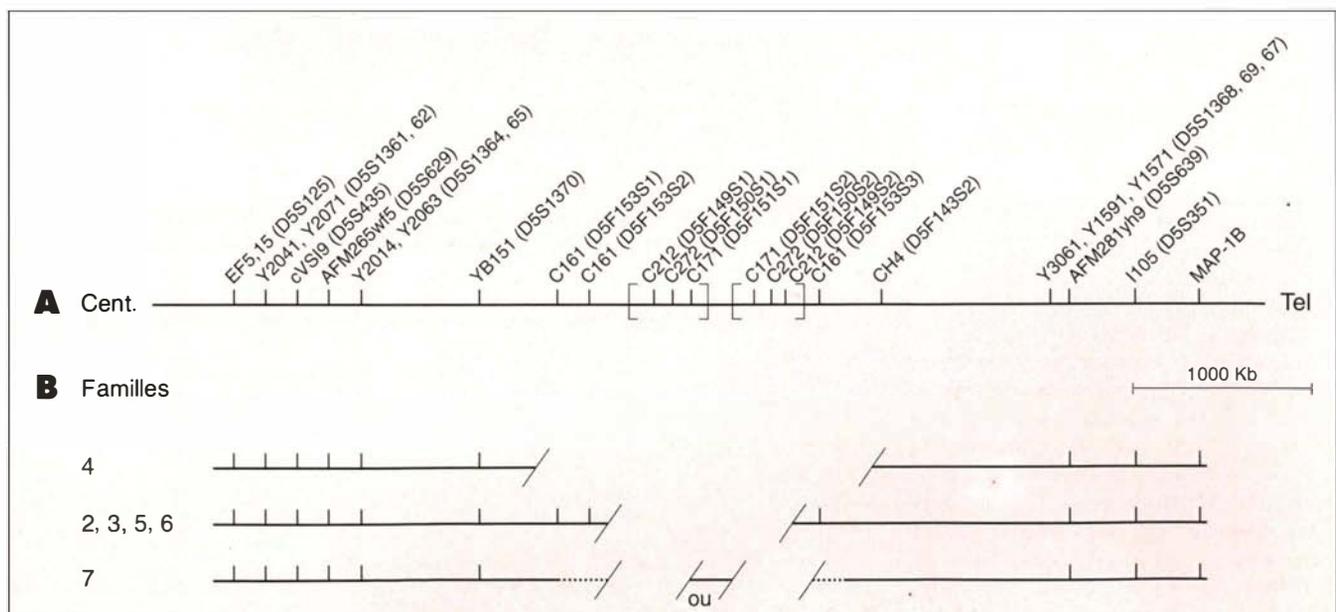


Figure 1. **Carte génétique des délétions chez les patients atteints de SMA.** A. Carte génomique de la région 5q13. Les différents marqueurs sont indiqués au-dessus de leur position génétique. Les parenthèses encadrant les blocs C212-C272-C171 indiquent que l'ordre des marqueurs à l'intérieur du bloc est inconnu. B. Carte génétique des délétions. Les tirets correspondent aux marqueurs montrés au-dessus. Dans la famille 7, la délétion peut entraîner, soit le bloc centromérique [C212-C272-C171], soit le bloc télomérique.

par la présence d'éléments répétés et spécifiques de cette région.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle la présence d'éléments répétés pouvait favoriser la survenue de réarrangements chez les malades, nous avons analysé la ségrégation des allèles aux *loci* détectés par les marqueurs C212 et C272 dans 201 familles de SMA non consanguines. Quarante-vingt-dix malades appartenaient au type I, quatre-vingts au type II et trente au type III. Nous avons observé que, chez sept malades non apparentés, tous les allèles détectés provenaient d'un seul parent (figure 2), indiquant que, soit l'autre parent avait transmis un chromosome avec une délétion des allèles étudiés, soit qu'il s'agissait d'une néo-mutation. Quatre d'entre eux étaient atteints de la forme de type I, deux de type II et un de type III. Un des malades de type I présentait un réarrangement survenu *de novo* n'emportant qu'un seul des deux *loci* reconnus par les marqueurs C212 et C272, signe probable d'une néo-mutation. Ces résultats partiels indiquent la présence de réarrangements emportant un allèle au *locus* morbide chez ces sept malades.

Parce que le nombre de malades présentant un réarrangement avait pu être sous-estimé par un défaut d'informativité des méioses, nous avons analysé le nombre de produits d'amplification par PCR distincts, révélés par les marqueurs C212 et C272 chez les familles de SMA des trois types ainsi que chez soixante témoins composés d'individus non apparentés. Nous avons observé une diminution, statistiquement significative, de la fréquence des hétérozygotes aux *loci* étudiés dans la forme de type I. Des résultats similaires ont été obtenus avec le marqueur C212. Aucun déséquilibre de liaison pouvant indiquer un effet fondateur n'a été observé et cette réduction de l'hétérozygotie n'est pas non plus liée à une consanguinité, même éloignée.

Aussi, avons-nous analysé avec le marqueur C161 les vingt familles de type I dont l'enfant atteint présentait cette réduction d'hétérozygotie. Dans deux des vingt familles, nous

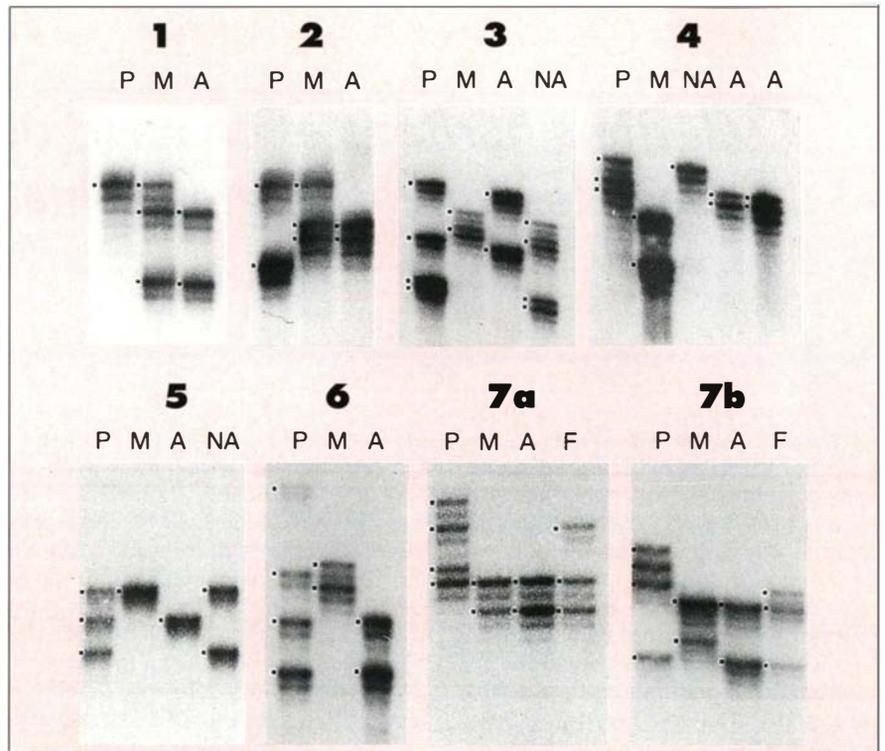


Figure 2. **Analyse de ségrégation des allèles parentaux aux loci détectés par les marqueurs C212 et C272 chez les patients.** La figure montre l'analyse des familles avec le marqueur C272 (familles 1, 2, 5 et 7b) ou avec le marqueur C212 (familles 3, 4, 6 et 7a). Les patients sont atteints de la forme de type I (familles 3, 5, 6 et 7), de type II (familles 1 et 2) ou de type III (famille 4). L'absence de contribution des allèles parentaux est d'origine paternelle dans les familles 1 et 2 et d'origine maternelle dans les familles 3, 4, 5 et 6. La construction des haplotypes avec les marqueurs flanquant le *locus* SMA a permis de déterminer que les enfants sains (NA) des familles 4 et 5 avaient reçu l'allèle muté de leur mère et l'allèle sain du père. Dans la famille 7, on note une transmission d'un allèle paternel (au lieu des deux attendus) à l'enfant atteint (A) avec les marqueurs C212 (7a) et C272 (7b). Le fœtus, dont l'haplotype, déterminé avec les marqueurs flanquant le *locus* SMA, est identique à celui de l'enfant atteint (données non présentées), a reçu les deux allèles attendus du père. P : père, M : mère, A : atteint, NA : non atteint, F : fœtus. Les points indiquent les fragments alléliques.

avons observé un réarrangement survenant *de novo* et emportant deux des trois *loci* détectés par le marqueur C161. Ces résultats confortent bien l'hypothèse selon laquelle la réduction de l'hétérozygotie aux *loci* détectés par les marqueurs C212 et C272 chez les SMA

de type I est due à une perte d'allèle à ces *loci*. Pour caractériser l'extension de la région 5q13 délétée chez ces malades, nous avons analysé ces familles avec les autres marqueurs polymorphes engendrés à partir de notre *contig* de YAC. La détermination complé-

te des haplotypes de ces familles nous a permis de cartographier les différentes délétions et de délimiter les bornes du plus petit remaniement entre les marqueurs C161 et C212-C272. Ces résultats suggèrent que le locus SMA se situe dans une région de 1,2 Mb contenue dans le YAC 903D1 (figure 1).

Enfin, l'isolement de fragments d'ADN voisins des microsatellites, utilisés comme sonde, a permis l'analyse en *Southern blot* des polymorphismes de longueur des fragments de restriction et du dosage génique dans ces familles. Celle-ci confirma alors la présence de délétions héritées ou *de novo*.

La présente étude [8] révèle l'existence de délétions emportant un allèle du locus morbide chez neuf enfants atteints non apparentés. De plus, la présence de délétions de la région 5q13 est fortement soutenue par l'observation d'une réduction allélique statistiquement associée à la forme sévère de la maladie (type I). Les délétions sont aussi rencontrées chez des malades de type II ou III. Des mutations alléliques distinctes pourraient expliquer l'expression clinique variable de la maladie. Ces résultats confirment aussi que le ou les gènes responsables des trois types de SMA se situent bien dans la même région. Cette étude démontre également que les délétions peuvent se produire *de novo* (néo-mutations), un fait qui pourrait expliquer la fréquence des formes apparemment sporadiques précédemment rapportée par plusieurs auteurs dans les SMA [9, 10] et jusqu'à présent assez mal comprise. Les délétions *de novo* de la région 5q13 peuvent également expliquer l'apparente hétérogénéité génétique des SMA [5, 11] quand, dans une même famille, un enfant sain présente le même haplotype que l'enfant atteint, déterminé avec les marqueurs flanquant le locus SMA. Cette observation est également importante pour le conseil génétique. En effet, l'apparente identité, entre un fœtus et l'enfant atteint d'une même famille, des haplotypes déterminés à l'aide des marqueurs flanquant le locus de l'amyotrophie spinale, peut conduire

à des erreurs de diagnostic prénatal lorsqu'une délétion *de novo* survient. Ces nouveaux marqueurs permettront désormais la détection d'un tel événement. La présence d'éléments répétés dans la région 5q13 peut expliquer l'instabilité de cette région, contribuant ainsi à l'apparition de délétions chez les sujets atteints de SMA par des événements de *crossing-over* inégaux. Finalement, la caractérisation de la plus petite délétion chez des malades atteints de SMA contribuera à l'identification du ou des gènes responsables des différentes formes de la maladie ■

#### Remerciements

Nous tenons à remercier les médecins et les familles pour leur collaboration et leur soutien ainsi que J. Frézal pour ses conseils. Ces travaux sont soutenus par l'Association française contre les myopathies (AFM), le Groupement de recherches et d'études sur les génomes (GREG), la Fondation de France, l'Association de recherche en gastroentérologie et nutrition (ARGAN) et l'Assistance publique, Hôpitaux de Paris.

**Judith Melki**  
**Suzie Lefebvre**  
**Lydie Burglen**  
**Philippe Burlet**  
**Olivier Clermont**  
**Sophie Reboullet**  
**Bernard Bénichou**  
**Massimo Zeviani**  
**Arnold Munnich**

*Unité de recherches sur les handicaps génétiques de l'enfant, Inserm U. 393, hôpital des enfants-malades, 75743 Paris, France.*

**Denis Le Paslier**  
**Daniel Cohen**

*Centre d'études du polymorphisme humain (CEPH), Paris, France.*

**Jean Weissenbach**  
**Philippe Millasseau**  
*Généthon, Évry, France.*

#### RÉFÉRENCES

1. Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980 ; i : 919-22.
2. Munsat TL. Workshop report. International SMA collaboration. *Neuromusc Disord* 1991 ; 1 : 81
3. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ott J, Munsat TL, Gilliam TC. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2q13.3. *Nature* 1990 ; 344 : 540-1.
4. Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, et al. Gene for proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990 ; 344 : 767-8.
5. Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels R, Byth BC, Knowles J, Hislop JE, Shapira Y, Dubowitz V, Munsat TL, Ott J, Davies KE. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990 ; 345 : 823-5.
6. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop M, Frézal J, Munnich A. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet* 1990 ; 336 : 271-3.
7. Clermont O, Burlet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, Lathrop M, Munnich A, Melki J. Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am J Hum Genet* 1994 ; 54 : 687-94.
8. Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboulet P, Bénichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. *De novo* and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 1994 ; 264 : 1474-7.
9. Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba JA, Borkowska J. Chronic proximal spinal muscular atrophy of childhood and adolescence : problems of classification and genetic counselling. *J Med Genet* 1985 ; 22 : 350-3.
10. Zerres K. Genetik spinaler Muskela-trophien. Habilitationsschrift Universität Bonn, 1988.
11. Daniels RJ, Thomas NH, MacKinnon RN, Lehner T, Ott J, Flint TJ, Dubowitz V, Ignatius J, Donner M, Zerres K, Rietschel M, Cookson WOC, Brzustowicz LM, Gilliam TC, Davies KE. Linkage analysis of spinal muscular atrophy. *Genomics* 1992 ; 12 : 335-9.