

Dystrophie myotonique de Steinert : encore une mutation instable

Alors que l'on se remettait à peine de la découverte surprenante de la mutation liée au syndrome de l'X fragile, voilà qu'à nouveau un triplet proliférique se révèle être la cause de la dystrophie myotonique de Steinert (DM). Il s'agit cette fois-ci d'une maladie autosomique dominante, et le triplet serait composé des bases CAG. La génétique de ces deux affections montre de toute évidence des points communs.

La DM est la maladie musculaire la plus fréquente de l'adulte puisqu'elle touche un sujet sur 7 000. C'est une affection caractérisée par une expressivité variable quant à l'âge de survenue des premiers signes cliniques, la rapidité d'évolution et le type de système impliqué. Allant d'une simple cataracte ou d'une calvitie à des anomalies musculaires (myotonie, amyotrophie) progressivement détériorantes, associées à une atteinte cardiaque, des troubles du comportement et des troubles endocriniens avec atteinte gonadique et stérilité, cette maladie peut survenir très précocement chez le nouveau-né. Cette forme dite « néonatale » ou « congénitale » est caractérisée par une hypotonie sévère généralisée avec détresse respiratoire, des malformations articulaires et des troubles de la succion et de la déglutition. Les rares enfants qui survivent montrent une arriération mentale profonde. Fait surprenant, cette forme néo-natale ne peut être transmise que par une femme et par environ 10 % seulement des femmes atteintes. De nombreuses hypothèses faisant intervenir des facteurs maternels et/ou une empreinte parentale ont été proposées pour expliquer cette bizarrerie génétique. Tout comme pour l'X fragile, un mécanisme d'anticipation avait été invoqué pour expliquer l'apparition de plus en plus précoce et l'aggravation des

symptômes de génération en génération. Il est en effet fréquent d'observer, sur trois générations, un grand-père pratiquement asymptomatique avec une calvitie ou une cataracte sénile, qui ne permettaient pas, à elles seules, de porter un diagnostic de DM, puis une mère avec atteinte musculaire caractéristique (myotonie, aspect caractéristique des fibres musculaires) et enfin, à la troisième génération, un enfant présentant la forme congénitale sévère.

La dystrophie myotonique de Steinert est la première maladie humaine pour laquelle a été démontrée, en 1954, une liaison génétique avec des marqueurs génétiques, le caractère sécréteur et le groupe sanguin Lutheran. La localisation du gène en cause, sur le chromosome 19, par liaison génétique, a été mise en évidence en 1983. Le locus DM, longtemps tenu pour être sur le bras court, est progressivement « descendu » sur le bras long (1985). Pourtant la localisation précise, en 19q13.2, n'est connue que depuis 1988. Cette progression est liée à l'apparition de nouveaux marqueurs plus proches, les gènes des apolipoprotéines E et CII (APOE, APOCII), et le gène de la créatine kinase musculaire (CKMM) et surtout à leur meilleure localisation. En effet, le chromosome 19, petit chromosome métacentrique, a pendant longtemps été difficile à caractériser cytogénétiquement et les rares remaniements chromosomiques n'ont que peu contribué à son découpage en sous-régions. La recherche du gène a donc été fondée essentiellement, jusqu'en 1989 environ, sur des études familiales afin de rechercher des marqueurs de plus en plus proches. Sur le côté proximal, CKMM, ERCC1 et ERCC2 (*excision repair cross complementing 1 et 2*), et sur le côté distal, D19S51, se situent à une distance d'environ

2 % de recombinaison. Plus récemment le gène s'est trouvé encadré par pEX0.8 (R. Korneluk, Ottawa, Canada) et X75 (B. Wieringa, Nijmegen, Pays-Bas) avec un recombinant pour chaque sonde, alors qu'aucune recombinaison n'avait été mise en évidence pour la sonde D19S63, supposée donc être plus proche (pD10, D. Shaw, Cardiff, GB).

Parallèlement, le groupe de Lawrence Livermore promu *Human Genome Center* (A. Carrano, H. Morhenweiser, P. de Jong, Livermore, USA) décidait de s'attaquer au chromosome 19, en raison de sa petite taille et de sa richesse présumée en gènes, pour mettre à la disposition de la communauté scientifique une carte complète de cosmides organisés en *contigs*. Un hybride somatique (20XP, M. Siciliano, Livermore, USA) n'ayant retenu qu'une petite partie du 19q, estimée à cinq mégabases et contenant les marqueurs encadrant le gène DM, a également joué un rôle capital. A partir de cet hybride, soumis à irradiation, des hybrides contenant de plus petits fragments chevauchants de la région 19q13.2 ont été obtenus. Ils ont servi à une meilleure localisation de clones isolés de diverses banques établies à partir de l'hybride 20XP. Une carte par électrophorèse en champs pulsés a été construite mais son établissement s'est heurté à certaines difficultés. La fréquence élevée des sites NotI et autres sites habituellement rares signalait la présence de nombreux îlots HTF [1], donc vraisemblablement de gènes et bien entendu de celui de DM sans avoir réellement de moyens de le reconnaître. De plus, certaines ambiguïtés demeuraient quant à la position et au nombre exacts de ces sites, rendant difficile le positionnement précis des sondes. Néanmoins, l'isolement de marqueurs (B. Wieringa, D. Shaw,

R. Korneluk, K. Johnson) aboutissait il y a un an à délimiter une région d'environ 200 kb accessible aux YAC. La véritable course au gène a alors démarré. Sur fond de cosmides alignés en *contigs* (P. de Jong, R. Korneluk, B. Wieringa), les YAC isolés à l'aide des sondes ERCC1, D19S63, D19S51 (K. Johnson, D. Shaw, B. Wieringa) sont venus se positionner sur environ 700 kb, mais non sans difficultés [2]. En effet les YAC étaient instables et avaient tendance à perdre une partie de leur séquence. Nous verrons que cette caractéristique n'est peut-être pas totalement étrangère à la nature du type de mutation impliquée dans DM. Quoi qu'il en soit, malgré cette instabilité, la recherche de séquences codantes s'est poursuivie grâce à diverses approches (D. Brook, Cambridge, H. Epstein, Houston, USA) et les différents groupes ont touché le but pratiquement simultanément ([2-4] et H. Epstein, communication personnelle) : des ADNc (ADNc25, lambda M9C, 45H9) ont pu être isolés à partir de banques de cerveau fœtal humain. Le(s) gène(s) correspondant(s) est (sont) en cours de caractérisation. Un polymorphisme biallélique EcoRI (allèles de 9,0 et 10,0 kb) a alors été mis en évidence sur une population de sujets normaux. La surprise devait être de taille : espérant trouver, au mieux, un ou deux remaniements de ce gène candidat chez des sujets atteints de Steinert, une bande anormale comprise entre 10 et 15 kb était détectée chez pratiquement tous les malades. Aucun fragment anormal compris entre 9 et 10 kb n'a été observé jusqu'à présent dans les populations étudiées, ce qui suggère que la mutation s'est produite, à l'origine, sur un chromosome portant l'allèle « 10 kb ». L'analyse de la séquence montre que l'ADN d'un sujet normal comporte une courte répétition du motif CAG (la phase n'est pas encore connue), alors que chez les sujets atteints de dystrophie de Steinert, cette répétition peut atteindre 5 kb. Autre surprise, il existe une corrélation entre la taille du fragment anormal et la gravité de l'atteinte : épousant la thèse du phénomène d'anticipation, le fragment s'accroît d'une génération à l'autre. Mais cet accroissement est, en moyenne, plus important lorsque le gène est transmis

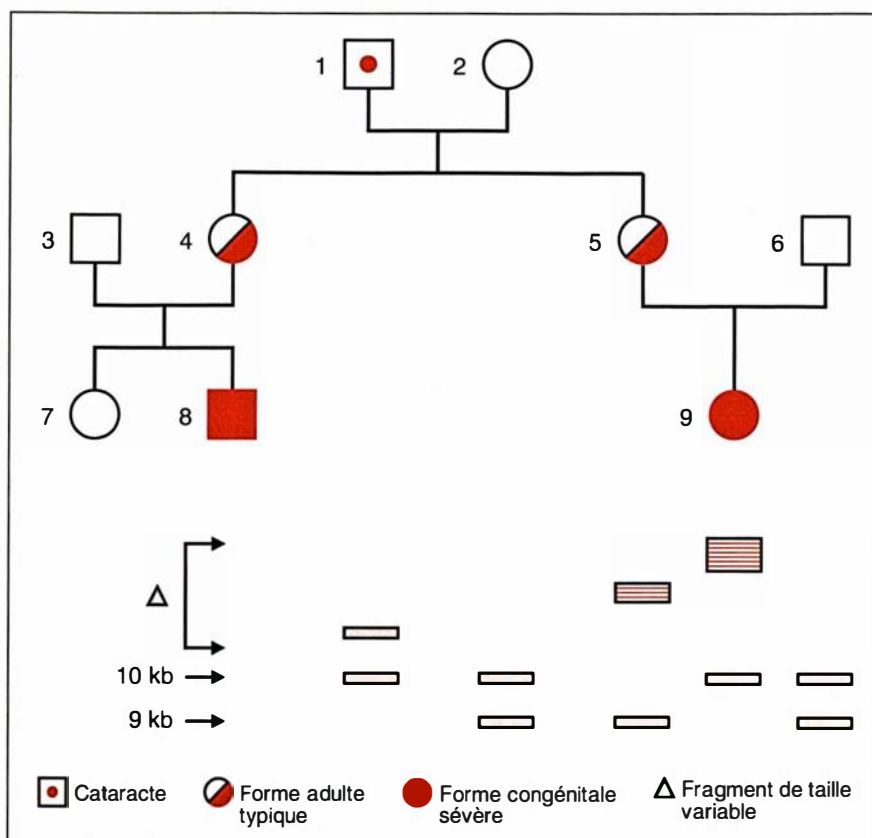


Figure 1. **Exemple du phénomène d'anticipation dans la maladie de Steinert : profil obtenu en Southern blot avec la sonde ADNc 25 de K. Johnson sur une famille.** Ce cas de figure avec deux sœurs atteintes (sujets 4 et 5) donnant, toutes les deux, naissance à des enfants atteints de forme congénitale (sujets 8 et 9) est fréquent. Existe-t-il une sorte de point de non-retour : une augmentation de taille telle que la femme atteinte aura systématiquement un enfant atteint de forme sévère ?

par une femme (de 0 à 4,5 kb en une génération) que lorsqu'il est transmis par un homme (de 0 à 2,5 kb) [4]. De plus, comme pour l'X fragile, le fragment anormal, lorsqu'il est supérieur à 11 kb, a un aspect de traînée (*smear* pour les anglophiles), indiquant une instabilité somatique [5, 6]. Selon toute logique le phénomène inverse, c'est-à-dire la diminution du nombre de répétitions, avait toutes les chances de se produire, et, en effet, une diminution de la taille du fragment apparemment corrélée à la diminution des signes cliniques a été observée dans quelques rares familles.

Mais le mystère n'est pas totalement résolu pour autant. Partant des travaux datant de 1986 du groupe de M. Ladzunski (Nice, France) [7], le groupe de

A. Roses (Durham, USA) a peut-être lui aussi fait une découverte importante. Le groupe français avait montré qu'un canal potassium dépendant du calcium (récepteur de l'apamine) normalement présent dans les tissus fœtaux était anormalement et spécifiquement exprimé dans le muscle de sujets DM. L'expression (activité ou présence) anormale du canal potassium dépendant du calcium est à l'origine d'une hyperpolarisation post-potential. Associée à la diminution du potentiel de repos par atteinte de l'ATPase (Na^+ , K^+), elle pourrait être responsable de la production répétée de potentiels d'action par le muscle DM. Le récepteur de l'apamine appartient à l'une des familles des récepteurs de type canal potassium et devait donc

être détectable par criblage d'une banque à l'aide de séquences oligonucléotidiques consensus correspondant à des domaines conservés de ces canaux. Le groupe d'A. Roses a ainsi isolé un gène codant pour un récepteur membranaire de type canal potassium dépendant du calcium, et... localisé dans le même cosmide que le gène candidat isolé par les autres groupes ([2] et Roses *et al.*, communication personnelle)! Les deux séquences « rivales » encadreraient la séquence CAG répétée. Il se pourrait même que la séquence répétée instable fût incluse dans le gène codant pour le canal potassium, modifiant ainsi ses capacités de phosphorylation ou de fixation du calcium. Cela évoque la localisation et l'amplification de la séquence répétée CGG dans le premier exon du gène FRM1 pour le syndrome de l'X fragile [8], et de la séquence CAG dans celui du gène du récepteur aux androgènes (AR) pour la maladie de Kennedy ou atrophie musculaire spinobulbaire ([9] et *m/s* n° 7, vol. 7, p. 752).

L'instabilité de cette région rappelle étrangement l'instabilité des YAC (isolés à partir d'individus normaux) [2]. Pourtant le taux de néo-mutation ne semble pas anormalement élevé dans la maladie de Steinert. Contrairement à la maladie de Kennedy, il semblerait qu'un petit nombre d'haplotypes, seulement, soient liés à la maladie de Steinert. Un déséquilibre d'association entre le marqueur D19S63 (Cardiff, Ottawa) et le locus DM initialement découvert dans des populations de Canadiens-Français atteints de DM, a été retrouvé dans des populations pour lesquelles un effet fondateur ne peut être invoqué. L'allèle 3 de D19S63 est beaucoup plus fréquemment associé à la maladie de Steinert dans des populations hollandaises, galloises, anglaises, françaises ou espagnoles, bien que dans une moindre mesure pour les deux derniers. Un haplotype « hollandais » est retrouvé dans la région d'Osaka (Japon) et en Afrique du Sud, régions toutes deux « visitées » par les marins hollandais. Le déséquilibre observé avec D19S63 dans la population française de DM est moins important, suggérant la survenue de mutations différentes de celle associée à l'haplotype en déséquilibre dans les autres populations (C. Lavedan *et al.*, soumis pour publi-

cation). Pourtant la sonde lambdaM9C permet de détecter un nouveau polymorphisme EcoRV, cette fois-ci en complet déséquilibre de liaison avec DM, dans une population galloise, suggérant une mutation commune apparue sur l'haplotype en déséquilibre [4]. Il sera donc intéressant d'étudier les sujets français DM et non DM avec ce nouveau marqueur. La « mutation originelle » en déséquilibre d'association avec ces différents marqueurs n'est pas connue. Il pourrait s'agir d'un environnement nucléotidique rendant la répétition normale des triplets plus instable. Pour le syndrome de l'X fragile, bien qu'il existe un déséquilibre de liaison complet entre deux marqueurs flanquant le gène FRM-1 chez des sujets normaux, aucune étude des haplotypes associés à la maladie n'a été rapportée. La différence d'accroissement de la séquence répétée entre homme et femme pourrait-elle être liée à une différence de fréquence de recombinaison méiotique dans cette région du génome ? Pourtant l'importance du déséquilibre d'association suggère que cette région n'est pas une zone de forte recombinaison méiotique. Quoi qu'il en soit, nous allons probablement rapidement comprendre pourquoi seules les femmes (et pas toutes !) transmettent à leurs enfants la forme congénitale. Il pourrait y avoir une limite à l'accroissement du nombre de répétitions, différente selon le sexe, ou bien encore une expression qualitativement ou quantitativement anormale du produit du gène maternel au cours de la grossesse. Il n'est pas non plus impossible que l'expression de plusieurs gènes soit touchée. Ces données bouleversent le contexte du conseil génétique. La fastidieuse recherche de mutation, individu par individu, devrait nous être épargnée dans la majorité des familles (environ 70 %). L'identification des sujets porteurs devrait désormais être un examen direct et non plus fondé sur une étude familiale indirecte reposant sur un diagnostic parfois ambigu en raison de la variabilité de l'expression et de la difficulté d'interprétation des examens cliniques ou biologiques. Cependant, comme pour toutes les maladies monogéniques, pour lesquelles il n'existe pas encore de traitement préventif, on peut se demander s'il est

opportun de communiquer à un individu les résultats d'une étude génotypique en dehors du contexte de diagnostic prénatal. Cela est particulièrement sensible lorsqu'il s'agit d'un mineur, comme le fait remarquer le Comité Consultatif National d'Éthique : « Peut-on dire à un enfant son destin biologique ? » [10].

L'ensemble de ces résultats a été rapporté par les différents groupes cités, lors du *Second International Workshop on Chromosome 19* (Nijmegen, Pays-Bas, 25-26 janvier 1992) ■

Claudine Junien
Christian Lavedan

*Inserm U. 73, château de Longchamp,
75016 Paris, France.*

RÉFÉRENCES

1. Jordan BR. Îlots HTF : le gène annoncé. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 153-60.
2. Aslanidis C, Jansen G, Amemiya C, *et al.* Cloning of the essential myotonic dystrophy region : mapping of the putative defect. *Nature* 1992 ; 355 : 548-51.
3. Buxton J, Shelbourne P, Davies J, *et al.* Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 1992 ; 355 : 547-8.
4. Harley HG, Brook JD, Rundle SA, *et al.* Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 1992 ; 355 : 545-6.
5. Oberlé I, Mandel JL. Retard mental avec X fragile : une empreinte génomique très localisée, étroitement liée à l'expression clinique. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 378-9.
6. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, *et al.* Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 1673-81.
7. Renaud JF, Desnuelle C, Schmid-Antomarchi H, Hugues M, Serratrice G, Lazdunski M. Expression of apamin receptor in muscles of patients with myotonic muscular dystrophy. *Nature* 1986 ; 319 : 678-80.
8. Fu HH, Kuhl DPA, Pizzuti A, *et al.* Variation of the GGG repeat at the fragile X site results in genetic instability : resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991 ; 67 : 1047-58.
9. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgene receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991 ; 352 : 77-9.
10. Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et la santé. Application des tests génétiques aux études individuelles, études familiales et études de populations (problèmes des « banques » d'ADN, des « banques » de cellules et de l'informatisation des données). *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 842-6.