

X fragile : quoi de neuf ?

L'analyse moléculaire du retard mental avec X fragile a porté ses premiers fruits en 1991. Depuis, les progrès vont bon train... Il s'agit en effet d'un surprenant mécanisme mutationnel, inconnu jusqu'alors, et dont on suppose désormais l'implication dans d'autres maladies génétiques humaines (voir *m/s*, p. 249 de ce même numéro). La première étape décisive a été précédemment rapportée par I. Oberlé (*m/s* n° 4, vol 7, p. 379). L'équipe de J.-L. Mandel (Strasbourg, France) avait en effet montré la méthylation spécifique, chez les patients présentant un retard mental, d'un îlot CpG situé dans le locus X fragile. L'isolement de marqueurs plus proches, *via* le clonage dans des chromosomes artificiels de levure (YAC) d'une région englobant le site fragile, a permis de montrer que le phénotype clinique et cytogénétique Fra(X) était associé à une augmentation de taille d'un fragment d'ADN situé en aval de l'îlot CpG méthylé. Ainsi, les allèles porteurs du site fragile ont une augmentation de taille de 700 à 3 000 paires de bases par rapport aux allèles normaux. Cette observation rendait d'emblée le diagnostic de la maladie et le conseil génétique beaucoup plus aisés que par l'approche cytogénétique ou par l'analyse de liaison avec les sondes adjacentes. En réalité, lorsque l'on étudie la ségrégation de la mutation au cours des générations, on n'observe jamais de passage direct d'un allèle normal à un allèle ayant inséré une séquence de plus de 700 pb. Il existe une première étape dite de prémutation, attestée par la présence d'une insertion de taille intermédiaire n'excédant pas 500 pb détectée chez les mâles normaux transmetteurs (NTM) et les femmes vectrices [1]. On peut ainsi résumer la situation de la façon suivante (figure 1) :

- la prémutation correspond à une insertion inférieure ou égale à 500 pb, qui n'est pas méthylée sur l'X actif.

Elle est dépistée, notamment, chez les mâles normaux transmetteurs ;

- la mutation complète correspond à une insertion supérieure ou égale à 700 pb, méthylée sur l'X actif et inactif ;

- lorsque l'augmentation de taille se situe entre 500 et 700 pb, le profil de méthylation peut être compatible avec une prémutation (absence de méthylation et phénotype clinique normal) ou

une mutation complète (méthylation et retard mental) ;

- les femmes conductrices sans retard mental peuvent présenter l'une ou l'autre anomalie. En effet, une mutation complète n'entraîne un retard mental que chez environ 50 % des femmes hétérozygotes ;

- enfin, 15 % des individus porteurs d'une mutation complète présentent également une prémutation. Cette

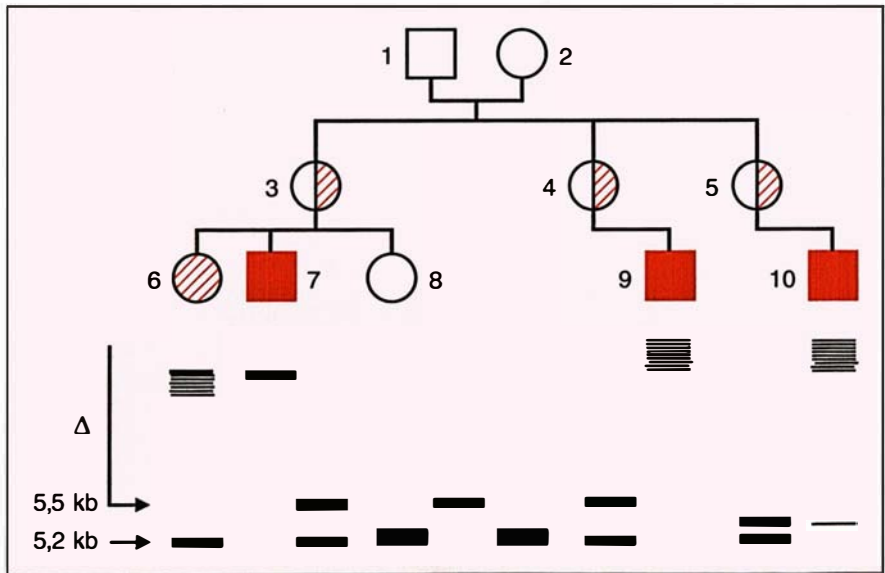


Figure 1. **Les différents profils de mutation après digestion EcoR1.** Les flèches indiquent la taille de l'allèle normal (5,2 kb) et celle de l'allèle porteur d'une prémutation (5,5 kb ou 5,3 kb). Δ représente l'augmentation de taille du fragment muté. Les garçons présentant un syndrome d'X fragile sont représentés par des carrés noirs, les filles saines sont représentées par des cercles entiers, les filles transmettrices sont représentées par des cercles divisés en deux parties. La partie droite hachurée correspond à un pourcentage d'X fragiles en culture supérieur à 4. La partie gauche hachurée correspond à un léger retard mental. Les individus 2 et 8 sont deux filles saines ; 1 est un mâle normal transmetteur porteur d'une prémutation ; 3, 4 et 5 sont des filles conductrices portant un allèle normal et un allèle muté ; 6 est une fille atteinte avec un allèle normal et un allèle porteur de la mutation complète ; 7, 9 et 10 sont trois garçons atteints avec mutation complète pouvant apparaître comme une bande unique (7) ou comme une bande floue (9 et 10) témoin de l'instabilité mitotique de la mutation. 10 est un cas de mosaïque car la bande correspondant à l'allèle prémuté est encore faiblement visible. (D'après Rousseau et Mandel [1].)

observation correspond vraisemblablement à la coexistence, chez les individus qui en sont porteurs, de cellules avec prémutation et de cellules avec mutation complète. Ces mosaïques sont vraisemblablement dues à la grande instabilité mitotique de la prémutation, à partir d'un certain seuil de longueur d'insertion.

Fort de ces résultats, une équipe américano-hollandaise [2] est alors entrée dans la course au gène responsable de cette maladie. Une séquence d'ADN complémentaire a été isolée à partir d'une banque de cerveau fœtal humain. Curieusement, l'analyse de ce messager révèle la présence d'une succession de 28 répétitions CGG, interrompue à deux reprises par un triplet AGG, suggérant l'existence dans la structure protéique potentielle de 30 résidus arginine successifs (on peut rappeler que de tels segments riches en arginine sont également retrouvés dans certaines protéines liées à l'ADN comme les histones). Le messager correspondant, 4,8 kb, est exprimé dans le cerveau, le placenta et les lymphocytes. En revanche, il n'est pas détecté dans le foie, le poumon ni le rein [2]. Enfin, l'implication dans la pathologie humaine de ce gène, désormais appelé *FMR-1* et particulièrement conservé au cours de l'évolution, a été démontrée : d'une part, le nombre de triplets CGG est considérablement augmenté chez les patients X fragiles ; d'autre part, il existe une corrélation entre cette mutation insertionnelle, l'hyperméthylation de la région, et l'absence d'expression du gène dans les lymphocytes ou les lymphoblastes de 16 patients X fragiles sur 20 étudiés [3]. Une expression du gène peu différente de la normale a été notée dans les quatre autres cas correspondant à une méthylation partielle de la région (voir *m/s n° 8, vol. 7, p. 877*).

Récemment, l'équipe de Caskey [4] a étudié par PCR le polymorphisme des répétitions CGG. L'analyse a porté sur 492 chromosomes X normaux provenant d'individus de quatre races différentes, révélant une variation de 6 à 54 répétitions CGG, et une fréquence d'hétérozygotes de 63 %. Les chromosomes X présentant une prémutation portent quant à eux 52 à 193 répétitions (figure 2). La marge entre allèle normal et allèle muté sem-

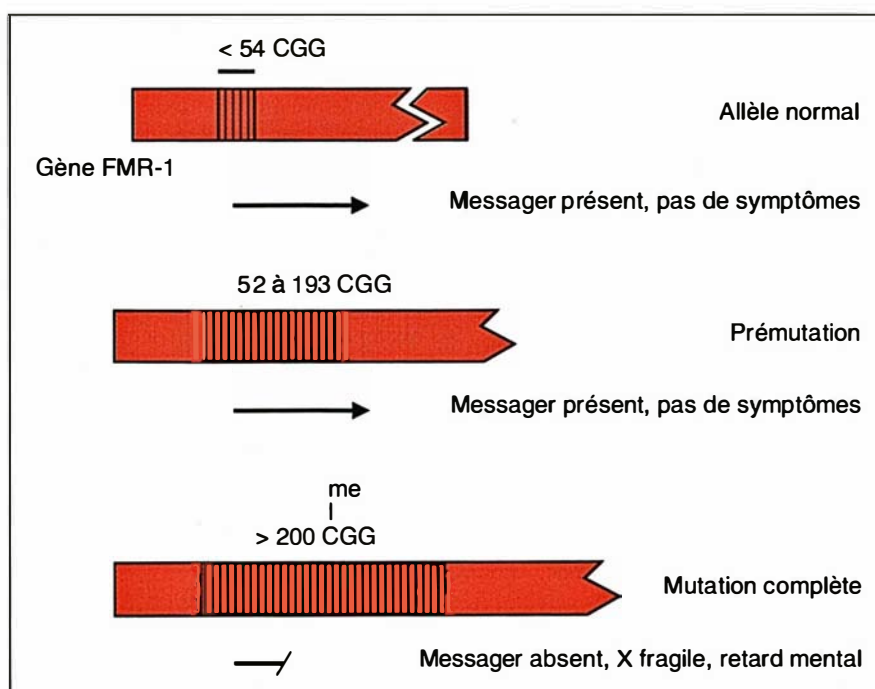


Figure 2. **Schématisation du gène *FMR-1* porteur ou non de la mutation X fragile.** Les triplets CGG sont représentés par des hachures verticales. L'allèle normal porte moins de 54 copies du triplet. L'allèle prémuté porte de 52 à 193 copies. L'allèle muté porte généralement plus de 200 copies. Le plus souvent, le messager correspondant est absent, et la région est méthylée (me). Il existe néanmoins des cas où la méthylation n'est que partielle et où le messager est présent.

ble donc très ténue, voire inexistante... Les auteurs ont ensuite voulu savoir si l'instabilité méiotique de la mutation était dépendante de sa taille. Ils ont donc étudié la ségrégation de cette variation de longueur au cours des générations. Les chromosomes portant moins de 46 répétitions sont transmis sans modification à la descendance. Au-delà de 52 répétitions, des modifications sont observées. Un allèle de plus petite taille peut être transmis, surtout pour des allèles dont le nombre de répétitions n'excède pas 70. En revanche, au-delà de 90 répétitions, l'allèle sera systématiquement transmis

à la descendance avec une augmentation de longueur.

Le Tableau ci-dessous résume la corrélation entre le nombre de répétitions CGG et le risque d'expansion à une mutation complète chez les femmes. Ces résultats moléculaires sont en accord avec les données de Sherman [5] qui, d'après l'observation du curieux mode de transmission de la maladie, avait établi le risque d'être atteint en fonction de la position du sujet dans la généalogie. En effet, la pénétrance est basse chez les frères (8,5 %) et haute chez les petits enfants mâles d'hommes normaux transmet-

Nombre de répétitions	% de risque
> à 90 (CGG)	100 %
< à 59 (CGG)	0 %
60 à 69 (CGG)	17 %
70 à 89 (CGG)	70 %

teurs (40 %). Les filles de ces derniers, en revanche, n'ont aucun risque. Cette adéquation entre les données d'observation et les données moléculaires a été appelée par les auteurs la résolution du paradoxe de Sherman.

Quel est le rôle joué par la méthylation dans la genèse de cette maladie ? Le passage de la prémutation se produisant essentiellement au cours de la méiose féminine, il est tentant d'impliquer le phénomène d'inactivation-réactivation de l'X au cours du développement embryonnaire du zygote XX dans la physiopathologie de la maladie. Cependant, si l'inactivation est réellement requise pour l'expansion de la mutation, seulement 50 %, et non 100 %, des allèles prémutés devraient augmenter de taille. Pour que cette hypothèse reste valable, il faudrait donc envisager une inactivation préférentielle du chromosome X muté dans les cellules progénitrices ovariennes. Il reste également possible que l'inactivation d'autres gènes méthylés intervienne dans le phénotype clinique. Gillespie a en effet montré qu'un gène situé à 1 centimorgan (théoriquement 1 000 kb) en aval de *FRM-1* présentait également une réduction d'activité chez les malades. Enfin, la fréquence spontanée des prémutations dans la population générale n'est pas encore connue mais semblerait, d'après les premières observations, atteindre un chiffre très élevé de quelques pour cent.

Une fois de plus, bien que la mutation de l'X fragile ait été mise en évidence, de nombreux éléments restent à résoudre dont l'essentiel est sans doute la compréhension de la fonction de la protéine potentielle et son intervention dans le phénotype clinique (retard mental associé à une macroorchidie et une légère dysmorphie faciale). Rien ne prouve, en effet, qu'il y ait traduction de cette longue et monotone répétition d'arginines. En attendant, il est possible d'assurer un diagnostic et un conseil génétique par l'analyse directe de la taille de l'insertion, associée à celle de la méthylation de l'îlot CpG adjacent. En effet, la corrélation entre la mutation complète et le retard mental chez le garçon atteint 100 %. En revanche, le retard mental, lié ou non à une fragilité de l'X *in vitro*, n'est pas toujours associé

à une mutation complète. Un tel cas de divergence a été rapporté par Hirst *et al.* [6] : il s'agissait d'un garçon avec un retard mental, porteur d'une prémutation, sans fragilité de l'X cytogénétiquement décelable. Une autre discordance a également été observée par l'équipe de J.-L. Mandel : l'analyse d'un patient avec retard mental et fragilité de l'X a révélé un nombre normal de copies CGG, suggérant l'existence d'un éventuel deuxième locus fragile dans la région Xq27. Le conseil génétique peut néanmoins parfois rester très délicat, notamment en cas de mosaïque. Des polymorphismes CA situés à une dizaine de kilobases de chaque côté du gène *FMR-1* et détectant jusqu'à 80 % d'hétérozygotes [7] permettent d'avoir recours à l'analyse de liaison dans ces cas difficiles.

La découverte des anomalies du gène *FMR-1* associées à la fragilité de l'X à ce locus ouvre la voie à un nouveau type de mutation, qui n'est pas longtemps resté isolée... Cette mutation insertionnelle en plusieurs étapes introduit une notion de seuil de tolérance, au-delà duquel il y aura expression de la maladie. Une fois de plus, la nature n'impose pas ses lois en tout ou rien, mais introduit de subtiles nuances qui sont aussi de véritables casse-tête pour les chercheurs... ■

Hélène Gilgenkrantz

Docteur en médecine, Inserm U. 129, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS A PART

H. Gilgenkrantz.

RÉFÉRENCES

1. Rousseau F, Heitz D, Biancalma V, *et al.* Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 1673-81.
2. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe J, *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991 ; 65 : 905-14.
3. Pieretti M, Zhang F, Fu YH, *et al.* Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991 ; 66 : 817-22.
4. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, *et al.* Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability : resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991 ; 67 : 1047-58.
5. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, *et al.* Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985 ; 69 : 3289-99.
6. Hirst MC, Nakahori Y, Knight SJL, *et al.* Genotype prediction in the fragile X syndrome. *J Med Genet* 1991 ; 28 : 824-9.
7. Richards R, Holman K, Kozman H, *et al.* Fragile X syndrome : genetic localization by linkage mapping of 2 microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet* 1991 ; 28 : 818-23.

Société Française de Microscopie Électronique

Prix Pierre Favard

La Société Française de Microscopie Électronique a créé le prix Pierre Favard en 1989. Il récompense la meilleure thèse dont l'outil principal d'étude est le microscope électronique.

★ DOSSIER 1992 ★

Thème : Biologie. — Thèse : soutenue entre le 1^{er} janvier 1990 et le 30 janvier 1992. — Dossier à déposer : 2 exemplaires de la thèse, 1 curriculum vitae. — Date limite de dépôt : **16 mai 1992.**

Renseignements et inscriptions : Société Française de Microscopie Électronique, 67, rue Maurice-Günsbourg, 94205 Ivry-sur-Seine Cédex, France. Tél. : (1) 46.70.28.44. — Fax : (1) 46.70.88.46.