

Deux percées sur le front des maladies neuro-musculaires : la myopathie facio-scapulo-humérale et la myopathie autosomique récessive maghrébine

Parmi les quelque 5 000 *loci* morbides répertoriés par McKusick [1], environ 50 % ont été localisés sur une région chromosomique. Dans moins de 10 % des cas, le gène en cause a été identifié, mais cette proportion devrait rapidement augmenter si l'on considère le rythme actuel des découvertes. La démarche adoptée consiste, le plus souvent, à localiser le gène en cause par cartographie génétique (analyse de liaison), puis par cartographie physique. Une fois le gène cerné dans un territoire physiquement circonscrit, il « ne reste plus » qu'à trouver une séquence faisant partie du gène recherché. Comme la plupart des gènes sont morcelés en exons, souvent nombreux et espacés, on conçoit les difficultés de cette « chasse aux exons ». Une fois la séquence codante établie par l'analyse de l'ADN, il suffit de reconstituer la séquence polypeptidique correspondante (ce que les ordinateurs font en quelques secondes). Cela fournit le portrait robot de la protéine issue du gène, élément décisif de réponse à la question essentielle du déterminisme physio-pathologique de l'affection considérée. Une autre étape décisive est celle qui consiste à valider la découverte, c'est-à-dire à prouver que le gène appréhendé est bien « le coupable ». Celle-ci est franchie lorsque l'on a démontré que le gène nouvellement découvert porte des lésions significatives, c'est-à-dire présentes chez les malades et non chez les sujets normaux. L'ensemble de cette stratégie a été longtemps appelé « génétique inverse », un terme somme toute assez commode, car il désigne la démarche cognitive (par opposition à la génétique traditionnelle) sans préjuger des procédés expérimentaux. A l'heure actuelle, le terme souf-

fre d'une certaine défaveur, d'une part parce que, loin d'être l'exception, cette démarche est devenue une procédure normale, qu'il est difficile de continuer à qualifier d'inverse ; d'autre part parce qu'on tend aujourd'hui à privilégier le procédé méthodologique pour qualifier la démarche. C'est ainsi que, lorsqu'un gène est découvert après avoir été d'abord localisé, puis cerné de plus en plus près l'on parle de « clonage positionnel » (*positional cloning*), terme proposé récemment par Collins [2]. Lorsque, par ailleurs, un gène est particulièrement suspecté sur la base d'une hypothèse physio-pathologique, on parle de stratégie du « gène candidat ».

Deux publications récentes illustrent ces démarches différentes appliquées à deux maladies neuro-musculaires : l'une de l'adulte, la myopathie facio-scapulo-humérale [3], l'autre de l'enfant, la myopathie autosomique récessive maghrébine [4].

La myopathie facio-scapulo-humérale (*locus* FSHD, pour *facioscapulohumeral dystrophy*, MIM n° 158900), nosologiquement individualisée en 1885 par Landouzy et Déjerine, est une maladie dégénérative du muscle, frappant d'abord les muscles de la face et de la ceinture scapulaire, puis s'étendant progressivement à d'autres groupes musculaires, surtout les racines des membres et l'abdomen [5]. C'est une maladie de l'adulte, les premiers symptômes apparaissant à l'adolescence. Elle est transmise sur le mode autosomique dominant avec une pénétrance complète, mais une expressivité très variable. Dans certains cas cependant on ne retrouve pas d'histoire familiale, ce qui suggère l'existence de

néo-mutations. Le déterminisme de cette affection est totalement inconnu, et aucune hypothèse physio-pathologique cohérente ne permet de désigner des gènes candidats plausibles. Comme pour la myopathie de Duchenne, c'est donc par analyse de *linkage* que tout a commencé. Cependant, contrairement à celle-ci où il existait des pistes (le gène était nécessairement sur le chromosome X, et sans doute en Xp21, point de cassure privilégié dans certaines formes de myopathie de Duchenne avec translocation X/autosome), la FSH n'a bénéficié d'aucun indice *a priori*, en particulier cytogénétique. C'est une affection autosomique, ce qui oblige à balayer les 22 autosomes. Une pareille entreprise nécessite un nombre important de méioses (pour avoir suffisamment d'événements de recombinaison, qui sont les seuls indicateurs), c'est-à-dire une collection importante de familles. Cela fut obtenu, comme c'est le cas le plus général, par la constitution d'un consortium international, qui a permis de rassembler toutes les familles en un *panel* mis en commun et partagé par les différentes équipes participantes. Le travail exhaustif et fastidieux d'exclusion des chromosomes les uns après les autres fut entrepris en 1988. En 1990, environ 80 % du génome avait été exclu, sans résultat positif [6], lorsqu'au Congrès international sur les maladies neuro-musculaires (Munich, Allemagne), la localisation primaire, tant attendue, était annoncée comme étant sur le bras long du chromosome 4 [7]. Il faut souligner que ce résultat fut acquis grâce à un changement radical de méthodologie, consistant à remplacer les RFLP, marqueurs relativement peu informatifs, par les

microsatellites. Ce terme désigne des courtes répétitions, le plus souvent dinucléotidiques, comme par exemple les séquences de type $(CA)_n$, où n (le plus souvent > 20) est sujet à des variations transmises de manière mendélienne [8]. Cela se traduit par des segments de taille variable aisément mis en évidence par l'analyse électrophorétique des fragments amplifiés *in vitro* par PCR. La variabilité de la taille de ces microsatellites, qui venait d'être découverte [9], en faisait des marqueurs génotypiques extraordinairement performants, car ils sont à la fois très informatifs (grand nombre d'allèles possibles) et très nombreux (répartition à peu près uniforme le long du génome). Cependant, leur exploitation systématique pour l'analyse de *linkage* des loci morbides, n'avait pas encore débuté*. La localisation primaire du locus FSHD sur le bras long du chromosome 4 fut la première illustration concrète de l'efficacité de ces nouveaux marqueurs. Grâce à une collaboration entre l'équipe de G. J. Van Ommen (Leiden, Pays-Bas) et celle de J. Weber (Marshfield, USA), où fut établie la première collection des microsatellites, une localisation sur le chromosome 4 fut obtenue en six semaines [7]. Par la suite, la localisation fut confirmée par le groupe de P. Harper à Cardiff (GB) [10], et affinée en 4q35, c'est-à-dire à l'extrémité du chromosome 4 [11]. Le territoire génétique ainsi défini était compris entre une série de marqueurs du côté proximal et le télomère lui-même, car aucun marqueur flanquant le locus du côté distal n'avait été trouvé (les positions respectives sont déterminées grâce aux recombinaisons observées). Il fallait concurremment dresser une carte physique de la région. Par un heureux hasard (la *serendipity* des Anglo-Saxons), l'équipe de Leiden s'intéressait, indépendamment, aux homéogènes, et parmi les cosmides intéressants que l'équipe avait isolés, l'un d'eux, le

* La chasse aux microsatellites hautement polymorphes et leur exploitation sont devenues, depuis, une activité essentielle des cartographes du génome humain. Le recours à une automatisation poussée, rendue possible par la méthodologie PCR, a considérablement accéléré les progrès. C'est ainsi qu'au Gendhron, l'usine à cartographier de l'AFM, Jean Weissenbach a caractérisé et localisé 800 nouveaux marqueurs de ce type en l'espace de quelques mois.

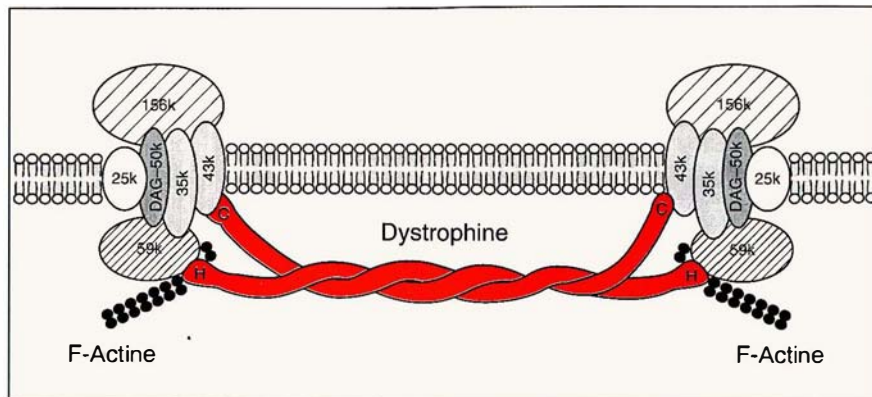


Figure 1. Schéma du complexe membranaire glycoprotéines/dystrophine. (D'après [27].)

clone 13E, se trouvait être localisé dans la même région du chromosome 4 que le gène FSH. Grâce à la lignée GM2346, qui porte une translocation entre le chromosome 4 et le chromosome 16, on put mettre en évidence, par hybridation *in situ*, que ce cosmide était exactement à cheval sur le point de cassure du chromosome 4, ce point étant plus proche du télomère que le plus distal des marqueurs proches du locus FSHD. Il était donc particulièrement intéressant, et pouvait enfin fournir le marqueur distal qui faisait défaut pour borner la région. Une sonde (p13E-11) dérivant de ce cosmide devait fournir un résultat surprenant : l'existence de fragments de digestion par EcoRI de taille anormale chez les malades. Alors que les chromosomes témoins portent dans 72 % des cas (43 chromosomes analysés) un fragment EcoRI/p13E-11 de taille supérieure à 28 kb, 100 % des chromosomes FSHD (16 chromosomes analysés) ont une taille inférieure à 28 kb (comprise entre 14 et 23 kb). Cette réduction de taille présente deux particularités génétiques qui la rendent hautement significative : (1) dans les formes familiales (10 familles étudiées), le fragment anormal ségrège rigoureusement avec la maladie ; (2) dans les formes sporadiques (6 cas), considérées comme des néo-mutations possibles, il se présente 5 fois sur 6 comme un événement survenant *de novo*. Ce dernier élément tend à faire penser que l'on est en présence non pas d'un simple déséquilibre de liaison avec un allèle particulier d'un marqueur proche du locus morbide, mais bel et bien d'un réar-

rangement directement impliqué dans le déterminisme de la maladie. En d'autres termes, il est très probable que la sonde p13E-11 ait permis de mettre le doigt sur une région du génome significativement réarrangée dans la myopathie facio-scapulo-humérale. Comme dans le cas de la myopathie de Duchenne [12], on aurait mis en évidence la lésion génomique avant d'avoir identifié le gène. Cette même précession des découvertes a eu lieu dans le syndrome de l'X fragile [13] et dans la myotonie de Steinert [14, 15], autres conquêtes récentes de la génétique inverse. Cependant, contrairement à ces deux dernières maladies, où l'anomalie est due à une mutation instable, le réarrangement observé sur le locus FSHD paraît être une délétion stable. A cause de sa situation télomérique extrême, et de la richesse en séquences répétitives de la région considérée, Wijmenga *et al.* [3] suggèrent que la lésion pourrait être favorisée par recombinaison non homologue entre chromatides sœurs. Quoi qu'il en soit, l'étape suivante est maintenant d'identifier le gène en cause. S'agit-il précisément de l'homéogène dont la piste est venue fortuitement croiser celle du gène FSHD ? La réponse ne devrait pas se faire attendre, car celui-ci est à moins de 50 kb de la région où siège l'anomalie du fragment EcoRI.

La myopathie autosomique récessive maghrébine (locus SCARMD, pour *severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*, MIM n° 253700) est une dystrophie musculaire progressive de

l'enfant assez semblable à la myopathie de Duchenne. Elle s'en distingue par un mode de transmission récessif autosomique, atteignant autant les filles que les garçons, et par une évolution un peu moins rapide, aboutissant à la mort entre 20 et 30 ans. Son individualisation nosologique est essentiellement due à Ben Hamida et Fardeau [16], à la faveur d'une étude exhaustive de nombreuses familles tunisiennes. Depuis, il s'est avéré que cette forme de myopathie est particulièrement fréquente dans les pays du Maghreb, où la plupart du temps elle est trouvée dans des familles consanguines : Tunisie [16], Algérie [17] et Maroc (A. Sefiani, communication personnelle). Sa fréquence n'a pas été estimée avec précision, mais il semble qu'elle soit aussi fréquente que la myopathie de Duchenne classique. En dehors de la notion, forcément inconstante, d'une atteinte d'individus du sexe féminin dans la famille, la myopathie maghrébine s'en distingue par un seul critère objectif : l'absence d'anomalie quantitative et qualitative de la dystrophine, appréciée par analyse immuno-histochimique, et par *Western blot* sur des biopsies musculaires [18]

Pour trouver le gène responsable de cette redoutable maladie, deux stratégies convergentes pouvaient être adoptées : celle du clonage positionnel, celle du gène candidat. Cette dernière a été payante, sur la base de l'analogie frappante entre la myopathie maghrébine et la myopathie de Duchenne. Une première piste était tentante, celle du gène autosomique codant pour une protéine présentant une homologie frappante avec la dystrophine, appelée *dystrophin related protein*, ou *DMD like protein*, en 6q [19, 20]. Elle dut être abandonnée, d'une part devant l'absence d'anomalie de cette protéine et de son ARN messager dans le muscle des malades atteints de myopathie maghrébine [21], d'autre part devant l'absence de liaison génétique entre le *locus* DRP et le *locus* SCARMD [22], ce dernier critère étant absolument décisif. Deux autres *loci* morbides candidats, contenant des gènes non encore identifiés, celui de la myopathie des ceintures à forme récessive (*locus* LGMD1, MIM n° 253600, en 15q15)

m/s n° 9 vol. 8, novembre 92

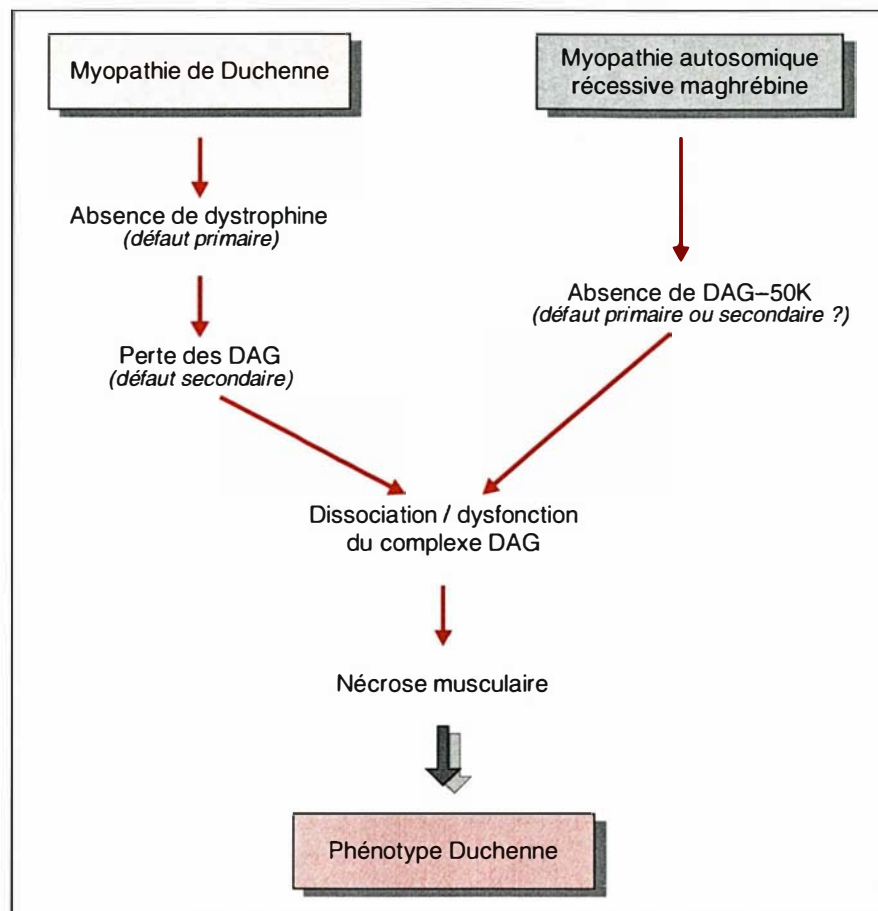


Figure 2. **Hypothèse physiopathologique expliquant le déterminisme des deux dystrophies musculaires progressives de l'enfant.** DAG : dystrophin associated glycoprotein. (D'après [4].)

[23] et celui de la myopathie des ceintures à forme dominante (*locus* LGMD2, MIM n° 159000, en 5q22-q34) [24], furent aussi abandonnés sur la base d'une analyse de *linkage* négative ([22] et Azibi *et al.*, manuscrit en préparation). Après la découverte par l'équipe de Campbell (University of Iowa College of Medicine, USA) d'un complexe oligomérique glycoprotéique enchâssé dans la membrane musculaire et amarrant la dystrophine au sarcolemme ([25-28] et *m/s* n° 10, vol. 7, p. 1090), chacune des protéines de ce complexe devenait un candidat plausible. En effet, ces protéines associées à la dystrophine (DAG, pour *dystrophin associated glycoproteins*, aussi appelées dystroglycans) semblent jouer un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité membranaire, en servant de trait d'union entre le cytosquelette sub-

sarcolemmique et la laminine, un composant de la matrice extracellulaire [27, 28] (figure 1). Six d'entre elles ont été identifiées grâce à des anticorps spécifiques. On les désigne par leur poids moléculaire : 156K, 59K (la seule à ne pas être une glycoprotéine et classée DAP, pour *dystrophin associated protein*), 50K, 43K et 35K. Un fait fondamental est leur disparition dans le muscle des malades atteints de myopathie de Duchenne, ou des souris *mdx*, deux situations où la dystrophine est absente. Cette disparition est un phénomène secondaire à l'absence de dystrophine, laquelle est sans doute indispensable au maintien de l'intégrité du complexe. Dans le cas de la myopathie autosomique récessive maghrébine, si proche cliniquement et histologiquement de la myopathie de Duchenne, on pouvait faire le raison-

nement inverse, et considérer qu'il pourrait s'agir d'un défaut primaire de l'un des constituants du complexe, même si le renversement de la proposition n'est pas complet, la dystrophine étant indemne chez ces malades.

La découverte d'un déficit en protéine DAG-50K chez quatre malades atteints de myopathie autosomique récessive maghrébine [4] est congruente avec cette hypothèse. Chez ces malades, soigneusement sélectionnés grâce à une collaboration franco-algérienne (à Paris : équipes des unités Inserm U. 153 et U. 129 ; à Alger : neurologues de l'hôpital de Ben Aknoun, et biologistes de l'hôpital de Bologhine), l'équipe de Campbell (Iowa City, USA) a appliqué la batterie d'anticorps préparés contre chacune des six protéines du complexe. Bien que les antigènes aient été purifiés à partir de muscle de lapin, les anticorps reconnaissent parfaitement les protéines humaines. Chez les quatre sujets atteints de myopathie maghrébine (dont une fille et un garçon de la même fratrie), tous les composants du complexe dystrophine-glycoprotéines se sont avérés normaux, tant en immunohistochimie que par *Western blot*, à l'exception de la protéine DAG-50K. Ce défaut paraît spécifique car il n'a été retrouvé dans aucune des huit autres maladies neuro-musculaires utilisées comme témoins. Si l'on compare le statut de ces protéines dans la myopathie de Duchenne et la myopathie maghrébine, dont les similitudes cliniques et histo-pathologiques sont si frappantes, on constate qu'il existe un commun dénominateur : l'absence de la protéine DAG-50K. Ce défaut est secondaire dans le cas de la myopathie de Duchenne, il est primaire, ou secondaire, dans la myopathie maghrébine (figure 2). L'étape suivante consiste à déterminer si dans ce dernier cas la disparition résulte d'une anomalie dans le gène correspondant (défaut primaire), ou non (défaut secondaire). Le débat sera tranché par une double approche génétique, dont les deux volets sont également indispensables : (1) analyse de liaison démontrant que le locus morbide SCARMD est totalement lié au gène candidat (celui de la protéine DAG-50K) ; (2) approche moléculaire à la recherche de muta-

tions dans ce gène. En attendant, deux conséquences immédiates découlent de cette publication franco-algéro-américaine : (a) la possibilité de diagnostiquer sans ambiguïté, grâce à un critère objectif, la myopathie maghrébine ; (b) la nouvelle vision de la physio-pathologie des dystrophies musculaires progressives, où la dystrophine, même si elle est l'élément causal dans la myopathie de Duchenne, n'est peut-être pas l'acteur principal à considérer, notamment dans les tentatives thérapeutiques ■

Jean-Claude Kaplan

Service de biochimie génétique et Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Inserm U. 129, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

RÉFÉRENCES

1. McKusick V. *Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes.* Baltimore and London : The Johns Hopkins University Press, 1990.
2. Collins F. Positional cloning : let's not call it reverse anymore. *Nature Genet* 1992 ; 1 : 3-6.
3. Wijmenga C, Hewitt J, Sandkuijl L, et al. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nature Genet* 1992 ; 2 : 26-30.
4. Matsumura K, Tomé F, Collin H, et al. Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992 ; 359 : 320-2.
5. Brooke M. *A clinician's view of neuro-muscular diseases*, 2nd ed. London : Williams and Wilkins, 1986 : 158-70.
6. Sarfarazi M, Upadhyaya M, Padberg G, Perikac-Vance M, Siddique G L, Lunt P. An exclusion map for facioscapulohumeral (Landouzy-Déjerine) disease. *J Med Genet* 1989 ; 26 : 481-4.
7. Wijmenga C, Frants R, Brouwer O, Moerer P, Weber J, Padberg G. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet* 1990 ; 336 : 651-3.
8. Weber J. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Curr Op Biotechnology* 1990 ; 1 : 166-71.
9. Weber J, May P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989 ; 44 : 338-96.
10. Upadhyaya M, Lunt P, Sarfarazi M, et al. DNA marker applicable to presymptomatic and prenatal diagnosis of facioscapulohumeral disease. *Lancet* 1990 ; 336 : 1320-1.
11. Wijmenga C, Padberg G, Moerer P, et al. Mapping of facioscapulohumeral muscular

dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and *in situ* hybridization. *Genomics* 1991 ; 9 : 570-5.

12. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, et al. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985 ; 316 : 842-5.
13. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991 ; 252 : 1097-102.
14. Harley H, Rundle S, Reardon W, et al. Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy. *Lancet* 1992 ; 339 : 1125-8.
15. 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.
16. Ben Hamida M, Fardeau M, Attia N. Severe childhood muscular dystrophy affecting both sexes and frequent in Tunisia. *Muscle and Nerve* 1983 ; 6 : 469-80.
17. Masmoudi A. Les dystrophies musculaires progressives en Algérie. Étude de 153 cas. Thèse de doctorat, faculté de médecine, Alger, 1986.
18. Ben Jelloun-Dellagi S, Hentati CP, Ben Hamida F, et al. Presence of normal dystrophin in Tunisian severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neurology* 1990 ; 40 : 1903.
19. Love D, Hill D, Dickson G, et al. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 1989 ; 339 : 55-8.
20. Khurana T, Hoffman E, Kunkel L. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin related protein. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 16717-20.
21. Khurana T, Watkins S, Chafey P, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromusc Dis* 1991 ; 1 : 185-94.
22. Azibi K, Chaouch M, Reghis A, et al. Linkage analysis of 19 families with autosomal recessive (Duchenne-like) muscular dystrophy from Algeria. *Cytogenet Cell Genet* 1991 ; 58 : 1907.
23. Beckmann J, Richard I, Hillaire D, et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *CR Acad Sci Paris* 1991 ; 312 (serie III) : 141-8.
24. Speer M, Yamaoka L, Gilchrist J, et al. Localization of an autosomal dominant form of limb-girdle muscular dystrophy to chromosome 5q. *Cytogenet Cell Genet* 1991 ; 58 : 1903.
25. Campbell K, Kahl S. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989 ; 338 : 259-62.
26. Ervasti J, Ohlendieck K, Kahl S, Gaver M, Campbell K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990 ; 345 : 315-9.
27. Ervasti J, Campbell K. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991 ; 66 : 1121-31.
28. Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti J, Leveille C, Slaughter C, Sernett S, Campbell K. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992 ; 355 : 696-702.