

■■■■ **La polycystine dans les tissus normaux et les reins polykystiques.**

La polycystine est une protéine membranaire de 968 acides aminés de fonction inconnue. Sa localisation subcellulaire a été étudiée par plusieurs auteurs, les derniers en date étant Geng *et al.* (Boston, MA, USA) [1]. Ces auteurs ont utilisé des anticorps dirigés contre un peptide synthétique contenant la première anse extracellulaire de la protéine humaine et contre une protéine de fusion contenant une portion du domaine intracellulaire carboxyterminal de la polycystine murine. La polycystine est localisée dans les membranes plasmiques, à la fois apicales et basolatérales, des cellules de l'épithélium des tubes du rein, des canalicules biliaires et des canaux pancréatiques; elle est également trouvée dans la peau, dans les kératinocytes et les follicules pileux. Une fixation cytoplasmique a été observée, associée à des structures mal définies. Elle est moins abondante chez l'adulte que chez le fœtus. Chez celui-ci, elle est présente dans l'épithélium du bourgeon urétéral et des canaux collecteurs qui en dérivent, mais elle est absente du parenchyme métabolique non induit. Enfin, la polycystine est surexprimée dans l'épithélium de 90 % des kystes rénaux où elle est essentiellement intracellulaire, ainsi que dans certains segments tubulaires non dilatés. Chez un malade *PKDI*, Ward *et al.* [2] ont observé une hyperexpression de l'allèle normal, ce qui est en claire contradiction avec les données de Qian *et al.* (*m/s n° 3, vol. 13, p. 410*) qui ont observé une perte d'hétérozygotie du locus *PKDI* au niveau des kystes de 8 malades, entraînant à ce niveau une absence d'allèle normal dans les cellules épithéliales. Comment peut-on réconcilier ces observations discordantes ? Une possibilité serait que la méthode de prélèvement des cellules épithéliales kystiques utilisée par Xiang *et al.*, un décollement par l'EDTA, ait sélectionné une sous-population de cellules épithéliales moins adhérentes

et donc plus aisément détachées par les chélateurs du Ca^{2+} . Ces cellules, homo- ou hémizygotiques pour l'allèle *PKDI* muté, dépourvues de polycystine normale, pourraient être à l'origine de la kystogénèse. D'autres cellules épithéliales, présentes dans le kyste, non détachées par l'EDTA, seraient hétérozygotiques pour la mutation et synthétiseraient la protéine normale en quantité augmentée du fait du défaut de différenciation associé (ou cause) de la kystogénèse. A noter que les observations de Geng *et al.* sont assez proches de celles de Ward *et al.* (Oxford, GB) [2], mais assez différentes de celles de Peters *et al.* (Leiden, Pays-Bas) [3] et de Palsson *et al.* (Boston, MA, USA) [4] qui ont détecté aussi de la polycystine dans l'épithélium glomérulaire, notamment dans les podocytes.

- [1. Geng L, *et al. J Clin Invest* 1996; 98: 2674-82.]
- [2. Ward CJ, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1524-8.]
- [3. Peters DJM, *et al. Lab Invest* 1996; 75: 221-30.]
- [4. Palsson R, *et al. Mol Med* 1996; 2: 702-11.]

■■■■ **Syndrome de Werner: de nouvelles mutations.** Le syndrome de Werner, maladie autosomique récessive caractérisée par un vieillissement prématuré, est dû à des mutations d'un gène codant pour une hélicase (*m/s n° 3, vol. 12, p. 403*), enzyme concourant au maintien de l'intégrité de l'ADN [1]. Initialement quatre mutations furent observées chez des malades, dont l'une, une transversion G → C sur un site donneur d'épissage aboutissant à un décalage de phase de lecture et à une protéine tronquée, fut retrouvée chez 60 % des malades au Japon, pays où la maladie est assez fréquente. Neuf nouvelles mutations viennent d'être découvertes [2] qui sont dispersées sur toute la longueur de la région codante: mutations ponctuelles non sens,

insertion de 105 pb, délétions de 74 pb et de 113 pb; elles ont toutes pour conséquence la production d'une protéine tronquée. Il est possible que ces protéines anormales soient rapidement dégradées, ce qui entraînerait une absence de protéine et aboutirait à un phénotype identique, ce qui est cliniquement le cas. Le fait qu'aucune substitution d'acides aminés n'ait été trouvée jusqu'à présent mérite d'être signalé. Certaines mutations sont retrouvées identiques chez des malades de différentes ethnies. Ainsi, la mutation au codon 1165 de CAG à TAG, observée à l'état homozygote chez un malade japonais [3] fut retrouvée chez une Française et chez un Turc. Cette constatation suggère une plus grande susceptibilité de certaines régions du gène aux mutations. Enfin, la fréquence des hétérozygotes composites chez des malades n'étant pas issus d'union consanguine laisse supposer que dans des pays où la maladie est rare, comme les États-Unis ou la France, la maladie de Werner n'est pas suffisamment évoquée et que sa fréquence est probablement sous évaluée.

- [1. Kahn A. *Med Sci* 1996; 12: 802-4.]
- [2. Oshima J, *et al. Hum Mol Genet* 1996; 5: 1909-13.]
- [3. Yu CE, *et al. Science* 1996; 272: 258-62.]

■■■■ **Craniosynostoses: quand l'excès de MSX2 devient dangereux.** Les craniosynostoses (fusions prématurées des sutures crâniennes) font partie de nombreux syndromes, pour la plupart d'origine génétique [1]. Au cours de ces dernières années, l'implication de gènes codant pour des récepteurs de facteurs de croissance (FGFR 1 et 2) permet de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques [2] et de revoir les anciennes classifications cliniques (*m/s n° 12, vol. 12, p. 1419*). Cependant, c'est un autre type de gène qui a pu être identifié

à partir de la grande famille originaires de Boston dans laquelle a été individualisée la forme CRS2 de craniosténose. En effet, Jabs *et al.* [3] ont localisé, en 1993, par analyse de ségrégation, un locus en 5q34-35, puis ont isolé le gène *MSX2* muté en position aminoterminal chez les malades de la famille et exclusivement chez eux : une histidine est substituée à une proline en position 7 de l'homéoboîte. Cette mutation semblait fonctionnellement délétère car cette proline est toujours présente en position 7 dans les gènes *Msx*, participant au site de reconnaissance de la séquence cible TAAT au niveau de l'ADN [4]. L'équipe californienne ayant trouvé la mutation montrait ensuite que des souris transgéniques porteuses de la mutation reproduisaient le phénotype de craniosténose malgré la présence des deux allèles endogènes de *Msx2* normaux, bien en accord avec le caractère dominant de cette mutation et un mécanisme de « gain de fonction ». Cependant, ce dernier ne correspondait pas à la synthèse d'une protéine « dominante négative », inhibant la fonction de la protéine *Msx2* endogène, comme cela est fréquent dans ce type de mutation : en effet, une hyperexpression du gène, normal, entraîne, elle aussi, une craniosténose, suggérant que la protéine mutante a un effet dominant positif [5]; cette hypothèse vient d'être confirmée par Ma *et al.* [6]. Les auteurs montrèrent d'abord que la protéine *MSX2* mutée avait plus d'affinité pour sa séquence cible d'ADN que la protéine normale. Cette affinité plus forte résulte d'une dissociation moindre du complexe formé avec le gène muté, comme cela a été montré dans des expériences de retardement sur gel du complexe *MSX2*/oligonucléotide spécifique : le complexe anormal était 2 à 3 fois plus résistant au déplacement par un excès d'oligonucléotide cible que le complexe normal. La mutation agit donc chez les malades en augmentant la stimulation des gènes cibles du facteur

MSX2, ce qui fait penser que le développement des os du crâne au cours de l'embryogenèse est très sensible aux variations de l'expression du gène *MSX2*.

- [1. Cohen MM. *J Med Genet* 1993; 47 : 581-66.]
- [2. Gilgenkrantz S. *Med Sci* 1995; 11 : 1748-51.]
- [3. Jabs EW, *et al. Cell* 1993; 75 : 443-50.]
- [4. Davidson D. *Trends Genet* 1995; 11 : 405-11.]
- [5. Liu YH, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 : 6137-41.]
- [6. Ma L, *et al. Hum Mol Genet* 1996; 5 : 1915-20.]

■■■■ **Les incertitudes du syndrome de Cockayne.** Le syndrome de Cockayne (SC) est une maladie récessive rare et sévère, caractérisée par un retard de croissance postnatal aboutissant à un nanisme, avec surdité, dégénérescence rétinienne, aspect sénile, retard mental et hyperphotosensibilité aux UV. Il fait partie de ces maladies dues à des mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, ou réparatases [1]. Par complémentation, il fut démontré que deux groupes pouvaient être distingués : CSA et CSB. Le syndrome de Cockayne de type B (CSB), le plus fréquent, correspond à des mutations du gène *ERCC6* (*excision repair cross complementing*) localisé en 10q11-q21, codant pour une protéine de la famille SNF qui comprend la protéine Snf2 de la levure (*sucrose non fermenting*), élément du complexe régulateur Swi/Snf qui agit en décondensant la chromatine des gènes transcrits [2]. Le syndrome de Cockayne de type A est dû à des mutations du gène *CSA* (ou *CKN1*), localisé sur le chromosome 5 [3]. Celui-ci corrige de façon spécifique l'hypersensibilité aux UV des cellules CSA et des mutations de ce gène furent observées chez certains malades. La protéine déduite semble

appartenir à la famille des protéines à répétition WD [4]. Ce type de domaine « à répétition WD » semble intervenir dans les interactions entre protéines et, de ce fait, CSA et CSB forment un complexe et pourraient être des sous-unités d'un complexe multimoléculaire intervenant dans la structure de la chromatine et dans la transcription. On retrouve des homologues de ces protéines dans la levure (comme la sous-unité β des protéines G) et la recherche dans les banques de données a permis de trouver une protéine de la levure homologue. Les gènes de levure analogues de *SCA* et de *SCB* furent appelés respectivement *RAD28* et *RAD26*. *In vitro*, dans le système d'excision-réparation de nucléotides (NER pour *nucleotide excision repair*), on sait désormais que les protéines XPB, XPD (XP pour *xeroderma pigmentosum*), p44 et p62, qui sont des sous-unités polypeptidiques de TFIIH (facteur de transcription de l'ARN polymérase II), interagissent avec les protéines XPG et CSB, ce qui renforce l'idée que le SC est bien dû à des anomalies de la réparation de l'ADN [5]. Cependant, de nombreux points restent obscurs : le modèle murin de CSB ne présente pas le même phénotype (pas de retard de croissance ni de lésions neurologiques). Les analogues de *SCA* et *SCB* de la levure ne sont pas sensibles aux UV et, de plus, ils sont capables d'une réparation spécifique normale du brin transcrit. Sans compter les relations complexes existant entre le CS et certaines formes de *xeroderma pigmentosum*, en particulier les groupes B, C et G. On a pu observer chez des sujets atteints de CS des manifestations cliniques de *xeroderma pigmentosum* et certains malades présentent des formes intermédiaires CS/XP. Mais, contrairement aux malades XP, les sujets atteints de CS ne présentent pas de cancers cutanés. Toutes ces discordances, sans remettre en cause le trouble de réparation de l'ADN dépendant de la transcription, font se demander

s'il s'agit vraiment du défaut primaire du syndrome de Cockayne [6]. En effet, on peut également imaginer que le complexe CSA/CSB agit prioritairement sur la transcription, mais différemment selon les gènes. Certains défauts observés, notamment ceux de la réparation de l'ADN, pourraient ainsi être la conséquence d'un défaut de la transcription de gènes différents de ceux touchés par la mutation responsable. Les réparatoses ont encore beaucoup à nous apprendre.

- [1. Sarasin A. *Med Sci* 1994; 10: 951-2.]
- [2. Schaeffer L, Egly JBT. *Med Sci* 1994; 10: 973-8.]
- [3. Henning KA, et al. *Cell* 1995; 82: 555-64.]
- [4. Neer EJ, et al. *Nature* 1994; 371: 297-300.]
- [5. Reagan IN, et al. *Biochemistry* 1996; 35: 2157-67.]
- [6. Friedberg EC. *BioEssays* 1996; 18: 731-8.]

■■■■ **BEACH et HEAT: la plage ensoleillée? Non! Les produits du gène codant pour la maladie de Chediak-Higashi.** La maladie de Chediak-Higashi (CHS) est une affection multisystémique caractérisée par un déficit immunitaire grave avec hypopigmentation, saignements fréquents et anomalies neurologiques. Elle est récessive autosomique et les enfants qui en sont atteints décèdent le plus souvent avant leur dixième année. Cette symptomatologie, ainsi que la présence de mélanosomes géants et de volumineux granules lysosomaux positifs pour la peroxydase caractéristiques de la maladie avait été observées depuis une vingtaine d'années dans deux lignées de souris et cette mutation, appelée *beige* (en raison du pelage), fut donc proposé comme modèle animal de la maladie de Chediak-Higashi (il faut mentionner que la maladie affecte aussi de nombreux autres animaux

comme le chat, le vison, la baleine). La mutation *beige* est portée par le chromosome 13 murin dans une région correspondant à la région terminale du bras long du chromosome 1 humain [1]. En juillet dernier, deux équipes concurrentes isolèrent des séquences codantes du gène murin [2, 3] mais, paradoxalement, il n'existait aucune région commune entre ces séquences. L'ensemble du puzzle vient enfin d'être assemblé car l'une des deux équipes ayant travaillé sur le modèle murin a isolé la séquence complète de l'ADNc du gène humain, localisé en 1q43. Par hybridation croisée, on peut voir que l'une des séquences murines correspond à la région 3' et l'autre à la région 5' [4]. Des complémentations réalisées entre fibroblastes de mutants de différentes espèces prouvent qu'il s'agit bien d'une homologie de gènes. Chez les premiers malades étudiés, trois mutations furent mises en évidence, deux entraînant une rupture du cadre de lecture et la troisième une mutation non sens. Le produit du gène contient un certain nombre de motifs de séquences qui permettent d'entrevoir ses fonctions dans les organites cellulaires: des motifs HEAT, qui pourraient jouer un rôle de transporteur vésiculaire; des motifs répétés WD (Trp-Asp), intervenant habituellement comme médiateurs dans les interactions entre protéines; un domaine globulaire α/β , correspondant à la protéine kinase de la levure, VPS15. *Vsp15* est un membre du groupe des mutants *vsp* qui, au lieu d'emmagasiner les hydrolases dans le compartiment vacuolaire, provoquent la sécrétion de leurs précurseurs solubles. Les auteurs proposent que le domaine très conservé entre les espèces qui doit, selon toute probabilité, avoir une fonction enzymatique, soit appelé BEACH pour *beige and CHS*. Ce gène a aussi une petite séquence commune avec le gène muté dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak. Tous deux jouent un rôle dans les organites cellulaires; mais, si l'on s'en réfère à la

souris, il reste encore une bonne dizaine de gènes analogues à découvrir, dont celui du syndrome de Griscelli, par exemple.

- [1. Fukai K, et al. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 620-4.]
- [2. Perou CM, et al. *Nature Genet* 1996; 13: 303-8.]
- [3. Barbosa MDFS, et al. *Nature* 1996; 382: 262-5.]
- [4. Nagle DL, et al. *Nature Genet* 1996; 14: 307-11.]

Utilisation des modèles *in vitro* en pharmaco-toxicologie

17 au 28 mars 1997

- Sous l'égide de la **Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire**, le laboratoire de Pharmacologie Cellulaire de l'École Pratique des Hautes Études organise une formation dont le but est de faire le point sur les progrès technologiques récents en matière de culture cellulaire et leurs apports dans le développement de méthodologies alternatives à l'expérimentation animale.
- Ce stage entre dans le cadre de la formation permanente et s'adresse aux chercheurs et techniciens scientifiques des secteurs privé et public.

RESPONSABLES SCIENTIFIQUES: Sylvie Demignot, Sophie Thenet-Gauci, Monique Adolphe, Laboratoire de Pharmacologie cellulaire de l'École Pratique des Hautes Études, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75006 Paris, France.

Tél. : 01 42 34 68 69
Fax : 01 44 07 10 52