médecine/sciences 1996 ; 12 : 1273-6

Quand la prévision permet la prévention

Nos lecteurs savent quelle est l'ampleur du débat concernant les conséquences individuelles, médicales et sociales de la médecine génétique de prévision. Dans certains cas, cependant, dont on espère qu'ils seront de plus en plus nombreux grâce à la compréhension des mécanismes pathogéniques et aux progrès des traitements préventifs, le diagnostic génétique présymptomatique d'une maladie a d'évidentes conséquences sur le plan de la prévention. Ainsi en va-t-il du locus de l'hémochromatose, puisque l'identification des homozygotes – et peut-être des hétérozygotes – peut conduire à une mesure aussi simple que des saignées (un don de sang !) régulières, de nature à éviter les graves conséquences de la surcharge en fer. Dans le cas de la polypose rectocolique familiale, les choses sont moins simples, puisque le traitement préventif est une colectomie totale et, selon les auteurs, une rectocolectomie si la mutation du gène APC ***siège dans la partie carboxyterminale de la molécule.***

Un bon gène candidat pour l'hémochromatose. Analyse d'homozygotie par descendance en l'absence de consanguinité

Le terme d'hémochromatose a été employé en 1889 par von Recklinghausen pour désigner l'ensemble des troubles liés au dépôt anormal de fer dans l'organisme ; le caractère héréditaire de l'affection et son mode de transmission autosomique récessif ont été déterminés ultérieurement. Cette maladie s'exprime habituellement entre 30 et 40 ans chez l'homme, plus tardivement chez la femme du fait des pertes de fer par les règles ou à l'occasion des grossesses. Dans les formes avancées de la maladie les signes cliniques témoignent des atteintes viscérales multiples : mélanodermie, hépatomégalie et cirrhose, ostéo-arthropathies, myocardiopathie non obstructive, diabète insulinodépendant, insuffisance gonadique d'origine hypophysaire. L'évolution spontanée de la maladie se fait vers la mort, le plus souvent par insuffisance cardiaque ou par apparition d'un hépatocarcinome. Le tableau précédent peut être qualifié d'historique car il ne s'observe plus aujourd'hui que de façon exceptionnelle ; le diagnostic est en effet porté le plus souvent sur bilan biologique provoqué sur signe d'appel (asthénie, arthralgies...) ou par la découverte d'une hypersidérémie. Ce diagnostic précoce repose donc sur l'exploration du métabolisme du fer qui vise à démontrer la surcharge (augmentation du fer sérique, du coefficient de saturation de la transferrine et de la ferritinémie) et à la quantifier, soit par approche histologique, soit par dosage chimique sur une ponction-biopsie hépatique. La justification de ce diagnostic précoce est l'existence d'un traitement simple et efficace : en effet des saignées régulières, dont le rythme est contrôlé par la surveillance de la férritinémie, préviennent l'apparition des signes cliniques et des complications de la maladie ; elles procurent alors aux malades une espérance de vie tout à fait normale.

Les évaluations qui ont été faites à ce jour font de l'hémochromatose la plus fréquente des maladies héréditaires, avec un sujet atteint sur 200 à 400 dans les pays celtiques (et donc plus d'un hétérozygote sur 10 personnes), 1 sur 1 000 dans les autres ethnies caucasoïdes. Le gène a été localisé il y a plus de vingt ans sur le bras court du chromosome 6 à proximité des gènes HLA de classe I et un effet fondateur a été soupçonné sur la fréquence élevée de l'allèle HLA-A3 chez les malades [1]. Plus récemment, la région candidate, d'abord limitée à la proximité immédiate des gènes HLA-A, a été étendue sur 2,5 à 3,5 mégabases en direction télomérique [2]. La découverte rapportée par la société américaine *Mercator Genetics* (Menlo Park CA, USA) a donc constitué une surprise puisque le gène candidat identifié est situé encore plus loin, à environ 4,5 mégabases [3].

Partant de l'étude de 101 sujets malades, cette équipe a donc entrepris de localiser, puis d'identifier ce gène en appliquant une méthode

décrite sous le nom de recherche d'homozygotie par descendance. Cette méthode, dans sa conception théorique, a été proposée en 1987 [4]. Elle repose sur l'hypothèse que l'origine commune d'une même mutation s'accompagne d'une homozygotie de l'environnement génique, et que la cartographie de cet environnement doit ainsi permettre la localisation de gènes récessifs. Pour la première fois, en 1993, la méthode de Lander a permis la localisation, puis en 1995 l'identification par l'équipe de Jean-Louis Mandel du gène de l'ataxie par déficit isolé en vitamine E [5]. La technique a été bien décrite dans *médecine/sciences* à cette occasion *(m/s n° 3, vol. 11, p. 472)*. Depuis lors, la même approche a été employée dans d'autres maladies, mais toujours en étudiant des familles dont la consanguinité était connue. Cette stratégie, appliquée dans le syndrome de Werner, a ainsi récemment permis de ramener de 8,3 cM à 1,6 cM l'intervalle potentiel de localisation du gène candidat [6, 7]. L'originalité du travail décrit ici est qu'il porte sur une série de malades non apparentés pour lesquels n'existait donc aucune notion connue de consanguinité, mais seulement l'hypothèse d'un effet fondateur commun.

La première étape a été l'établissement d'un *contig* de chromosomes artificiels de levure (YAC) se chevauchant partiellement et s'étendant sur 6 Mb, entre un marqueur proche du locus *HLA-A (D6S265)* et un autre marqueur beaucoup plus télomérique *(D6S276)*, à l'aide de tous les marqueurs polymorphiques et des STS *(sequence tagged-site)* précédemment connus [8]. La région centrale de 3 Mb a également été recouverte par un *contig* de divers clones bactériens (BAC, PAC et P1). A partir de tous ces clones, un grand nombre de nouveaux marqueurs polymorphiques, microsatellites ou simples mutations ponctuelles, a été identifié. L'étape suivante a été l'analyse génétique de l'ensemble de la région clonée chez les 101 malades et chez 64 témoins en étudiant les distributions alléliques de 45 marqueurs. Deux approches complémentaires ont été utilisées : (1) des études de déséquilibre de liaison en évaluant son intensité à l'aide du coefficient *p excess* et, d'autre part, de façon originale par un coefficient appelé F destiné à mesurer le degré de déséquilibre par rapport à la loi de Hardy-Weinberg c'est-à-dire l'excès d'homozygotes observé à chaque locus ; parallèlement avait été faite l'hypothèse que, pour chaque marqueur, l'allèle présent chez les malades avec la plus grande fréquence par rapport aux témoins appartenait à l'haplotype ancestral. Les résultats obtenus avec ces deux coefficients étaient concordants : (1) ils aboutissaient à reconnaître au milieu d'une vaste région de 4 Mb une zone de plus grand déséquilibre de liaison sur environ 600 kb (dans cette zone des valeurs du *p excess* de 0,81 conduisait à émettre l'hypothèse que 80 % des chromosomes étaient porteurs de L'haplotype ancestral) ; (2) une analyse de 46 chromosomes choisis parce qu'ayant toutes probabilités de correspondre à l'haplotype ancestral et préalablement isolés en lignées d'hybrides somatiques ; une convergence s'est dégagée, délimitant une région de 250 kb (entre les marqueurs D6S2238 et D6S2241) qui apparaissait dans une phase allélique identique sur 41 des 46 chromosomes mais seulement chez 2,3 % des témoins. Une dernière étape a été l'identification des gènes présents dans cette région par sélection d'ADNc, piégage d'exons et, pour finir, séquençage systématique. Ainsi ont pu être caractérisés 15 gènes, 12 gènes d'histone, et 3 gènes encore inconnus. La logique de l'hypothèse a été poursuivie : en cas d'homozygotie par descendance, la mutation ancestrale devait se retrouver chez un nombre élevé de malades (~80 %) et être rare (~5 %) chez les témoins. Une seule mutation dans un seul gène, appelé *HLA-H*, répondait à ce critère, G → A en position 845 (mutation Cys^{282} → Tyr au niveau protéique). Toujours associée à l'haplotype ancestral, elle est retrouvée chez 85 % des 356 chromosomes malades et chez 3,2 % seulement des témoins. Une seconde mutation, His^{63} → Asp, retrouvée huit fois chez des hétérozygotes composites, portait à 87 % la fréquence allélique totale chez les malades. Depuis 15 ans la nomenclature internationale du gène de l'hémochromatose est *HFE* ; l'adoption du terme *HLA-H* par les auteurs est regrettable car elle est source de confusion avec le pseudogène du même nom, connu et localisé de longue date au voisinage du gène *HLA-A*. Nous pensons donc qu'il est préférable d'appeler le gène décrit par l'équipe de Mercator *HFE*. Sur la base des résultats actuels, la mutation Cys^{282} → Tyr peut être considérée sans difficultés majeures comme « délétère », en revanche, l'interprétation est plus difficile pour la mutation His^{63} → Asp, en raison de sa fréquence élevée dans la population générale (15 à 20 %) ; il pourrait ne s'agir que d'un simple polymorphisme marquant sur certains chromosomes une mutation *HFE* encore non identifiée.

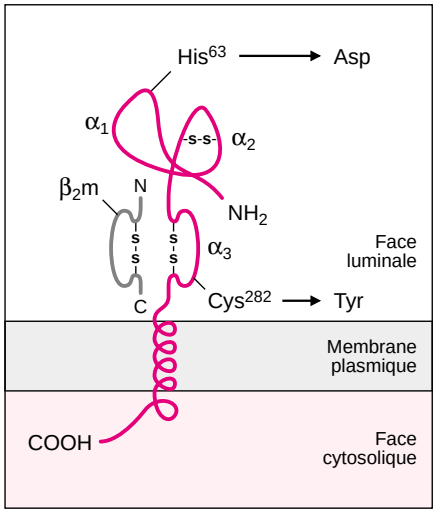

Figure 1. ***Structure proposée de la protéine HFE, par homologie avec les protéines CMH de classe I.*** *La partie extracellulaire comporterait trois domaines à partir de l'extrémité aminoterminale, α1, α2 et α3. La β2-microglobuline se lierait de façon non covalente au domaine α3. Les ponts disulfure des deux protéines étant nécessaires à cette liaison, la mutation Cys^{282} → Tyr déstabiliserait cette liaison. La mutation His^{63} → Asp, située en surface, aurait un retentissement fonctionnel limité. La protéine HFE comporte ensuite un domaine transmembranaire et un court segment cytosolique.*

En accord avec la symptomatologie clinique très polyvalente de la maladie, le gène *HFE* est exprimé sous forme d'un transcrit majeur de 4 kb dans tous les tissus sauf le cerveau, avec une intensité faible mais pratiquement identique d'un type cellulaire à l'autre. La protéine HFE de 343 acides aminés codée par le gène *HFE* présente des similitudes importantes avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, en particulier la présence de quatre cystéines également espacées, qui forment des ponts disulfure au niveau des domaines $\alpha 2$ et $\alpha 3$, assurant aux molécules de classe I la conformation nécessaire à l'interaction non covalente avec la β_2-microglobuline (β_2m) ainsi qu'une présentation correcte à la surface de la cellule *(figure 1)*. La mutation $Cys^{282} \rightarrow$ Tyr, la plus fréquente, pourrait désorganiser un domaine présumé de liaison de la β_2m. A l'appui de cette hypothèse du lien entre β_2m et hémochromatose, on peut arguer du fait que les souris $\beta_2 m^{-/-}$ développent une surcharge martiale tissulaire progressive [9]. La structure de la protéine ne semble pas permettre la liaison d'un métal ; en revanche, la fonction de HFE pourrait être l'internalisation ou le recyclage d'un ligand par l'intermédiaire d'un récepteur. Toute explication devra évidemment tenir compte du fait que l'absorption du fer a lieu au niveau de la muqueuse intestinale, le défaut primaire se situant sans doute au niveau du transfert du fer de la face basolatérale de l'entérocyte vers le plasma, et qu'un des sites majeurs de dépôt du fer est le foie [10]. En l'absence d'études fonctionnelles, on est réduit à des hypothèses sans argument d'évidence. La molécule pourrait être le récepteur d'un ligand fixant le fer, son action, normalement de contrôle négatif, étant inactivée par la mutation. Une autre possibilité serait un rôle dans la transmission d'un signal, la protéine HFE sensible au niveau du fer plasmatique contrôlant le fonctionnement d'un autre gène. Le mode d'action pourrait, enfin, être encore plus indirect, s'exerçant par association avec des éléments du système immunitaire pour influencer le métabolisme du fer. Ainsi, l'ensemble des données expérimentales fournit évidemment des arguments forts, mais pas de preuve formelle, pour une candidature du gène *Mercator* à être le gène *HFE*. Il reste cependant une possibilité que ce gène soit simplement un marqueur, mais lié de façon très étroite à la maladie. Quoi qu'il en soit, la recherche des deux mutations est d'ores et déjà utilisable comme critère diagnostique*.

** Sur un groupe de 65 malades que nous étudions depuis longtemps et chez lesquels le diagnostic a été porté sur des critères très stricts, y compris cliniques, nous retrouvons des fréquences alléliques de 93,1 % pour la mutation Cys282 → Tyr (dont 90,8 % à l'état homozygote) et de 5,4 % pour le variant His_{63} → Asp, soit au total 98,5 % entre les deux mutations. Nous confirmons donc et nous amplifions les résultats de Mercator. Nous proposons dès à présent d'effectuer la recherche de ces deux mutations : Laboratoire de génétique moléculaire, CHU de Rennes. Secrétariat – tél. : 02 99 28 42 71 et 02 99 28 58 77.*

Depuis une quinzaine d'années, le diagnostic d'hémochromatose était porté le plus souvent sur de simples critères biologiques. L'inconvénient conceptuel de cette pratique est qu'elle conduit à assimiler toutes les surcharges biologiques primitives en fer à une hémochromatose héréditaire. La situation qui vient d'apparaître de mutation, sinon unique, du moins en nombre très limité, permet aujourd'hui d'envisager un diagnostic génotypique direct dont la généralisation devrait amener à revoir la nosologie des surcharges biologiques en fer. Par ailleurs, cette maladie fréquente, facilement maîtrisable par un traitement peu coûteux, devient également un bon candidat à dépistage par ce test génotypique. Ce dépistage doit-il être systématique, étant donné la fréquence de la maladie, ou n'être pratiqué que devant un signe d'appel ? ■

RÉFÉRENCES

1. Simon M, Bourel M, Fauchet R, Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic hæmochromatosis. *Gut* 1976 ; 17 : 332-4.

2. Jazwinska EC, Lee SC, Webb SI, Haliday JW, Powel LW. Localization of the hemochromatosis gene close to D6S105. *Am J Hum Genet* 1993 ; 53 : 347-52.

3. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hæmochomatosis. *Nature Genet* 1996 ; 13 : 399-408.

LE COMITÉ CONSULTATIF NATIONAL D'ÉTHIQUE POUR LES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

a été créé en 1983 par le président de la République et est désormais inscrit dans la loi. Il rassemble une quarantaine de membres venant d'horizons très variés, qui réfléchissent aux dangers que les avancées de la science peuvent susciter. Organisme purement consultatif, sa mission est de « donner des avis sur les problèmes éthiques soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé et de publier des recommandations sur ces sujets ».

- Le Comité souhaitant participer à l'information du public et de toutes les professions intéressées publie, chaque trimestre, **« Les Cahiers du Comité consultatif national d'éthique »**.
- Chaque numéro des **« Cahiers du Comité »** est centré sur un thème ayant fait l'objet d'un avis récent du Comité. Il diffuse le texte intégral de l'avis accompagné de son rapport. Il présente une bibliographie, une étude de la situation à l'étranger et de libres propos d'intervenants extérieurs au Comité. Cette présentation des travaux du Comité faisant place à des données internationales, à de libres opinions permet d'avoir une appréciation plus globale des problèmes abordés.

L'abonnement aux « Cahiers du Comité consultatif national d'éthique » (4 numéros par an) est de 185 F.

Pour tout renseignement, s'adresser à madame Anne Bernard au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, 71, rue Saint-Dominique, 75007 Paris. Tél. : 01 44 42 48 52/53 - Fax : 01 44 42 48 48.

RÉFÉRENCES

4. Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 1987; 236: 1567-70.

5. Ouahchi K, Arita M, Kayden HJ, *et al.* Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the α-tocopherol transfer protein. *Nature Genet* 1995; 9: 141-5.

6. Nakura J, Miki T, Ye L, *et al.* Narrowing the position of the Werner syndrome locus by homozygosity analysis. Extension of homozygosity analysis. *Genomics* 1996; 36: 130-41.

7. Kahn A. Réparation, cancer et sénescence: le gène du syndrome de Werner. *médecine/sciences* 1996; 12: 802-4.

8. Jordan B. Le festival des ADNc. *médecine/sciences* 1996; 9: 211-6.

9. Rothenberg BE, Voland JR. β2 knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1529-34.

10. McLaren GD, Nathanson MH, Jacobs A, Trevett D, Thomson W. Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 390-401.

Jean-Yves Le Gall

Université de Rennes I, UPR 41 Cnrs, Faculté de Médecine, 2, avenue du Pr-Léon-Bernard, 35043 Rennes Cedex, France.

Dominique Labie

Inserm U. 129, CHU Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

J.Y. Le Gall.

m/s

octobre 1996

Vient de paraître
Numéro spécial

30 ANS DE RECHERCHE AU DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE DU CNRS

BRÈVES

Un modèle animal de maladie de Charcot-Marie créé par transgenèse. La maladie de Charcot-Marie (Charcot-Marie-Tooth pour les auteurs anglo-américains) est la plus fréquente des neuropathies périphériques en pathologie humaine. Il en existe plusieurs formes dont l'une des plus communes, la CMT de type 1A, est due à une duplication partielle du chromosome 17 entraînant une duplication du gène et une augmentation de la synthèse de la protéine périphérique 22 de la myéline PMP22 *(peripheral myelin protein-22)*. La maladie est caractérisée par une faiblesse musculaire d'origine nerveuse, avec hypertrophie des cellules de Schwann et hypomyélinisation. A noter que la carence en PMP22 est également associée à des anomalies de myélinisation *(m/s n° 11, vol. 9, p. 1273)*. Le rôle de l'amplification du gène *PMP22* et de la synthèse accrue de la protéine a été mis en cause par certains. Deux équipes européennes comportant des chercheurs allemands, britanniques, suisses et français ont voulu directement tester l'influence d'une augmentation du nombre de copies du gène *PMP22* chez le rat, modèle animal habituellement étudié pour analyser la différenciation des cellules de Schwann et la myélinisation [1] et chez la souris [2]. Des rats et des souris transgéniques ont donc été créés. Les animaux hétérozygotes pour l'addition d'une répétition d'environ trois fragments *PMP22* ont des lésions et des symptômes mimant de très près ceux de la maladie de Charcot-Marie. La symptomatologie est encore plus grave chez les homozygotes. La protéine PMP22 joue donc un rôle essentiel dans la différenciation des cellules de Schwann qui est perturbée en cas d'excès aussi bien que d'insuffisance de synthèse. Dans le premier cas, la symptomatologie est celle d'une maladie de Charcot-Marie; dans le second, elle est celle d'une neuropathie héréditaire avec tendance à des paralysies aiguës secondaires à la pression (HNPP, *hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*) *(m/s n° 5, vol. 10, p. 590)*. Plus généralement, d'ailleurs, la myélinisation est certainement un processus extrêmement complexe facilement perturbé puisqu'une duplication du gène *PMP* codant pour le protéolipide de la myéline entraîne également des anomalies de myélinisation similaires à celles de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher *(m/s n° 4, vol. 10, p. 487)*.

[1. Cerada M, *et al. Neuron* 1996; 10: 49-60.]

[2. Huxley C, *et al. Hum Mol Genet* 1996; 5: 563-9.]

La souris *mdx* déficiente en MyoD, un phénotype sévère mimant les myopathies de Duchenne et de Becker. Quoique les souris *mdx* soient déficientes en dystrophine, leur phénotype est beaucoup moins sévère que celui des malades atteints de myopathie de Duchenne [1]. En effet, la dégénérescence musculaire est compensée par une régénération très efficace. Par ailleurs, des souris rendues par recombinaison homologue totalement déficientes en MyoD, un facteur de différenciation myogénique, ont un phénotype pratiquement normal *(m/s n° 5, vol. 12, p. 639)*. Cependant, la combinaison des deux anomalies (souris *MyoD*$^{-/-}$/*mdx*) ont une myopathie beaucoup plus sévère que les souris *mdx* et meurent prématurément. L'anomalie siège au niveau de la régénération, qui est très perturbée. MyoD semble donc avoir une fonction importante dans la régénération musculaire au cours de laquelle les cellules satellites deviennent des myoblastes proliférants, puis des myotubes. En l'absence de MyoD, on pourrait assister à un auto renouvellement de ces cellules satellites qui ne s'engageraient pas, ou du moins insuffisamment, dans la voie des différenciations myogéniques. Puisque la grande différence entre symptomatologie des hommes et des souris déficients en dystrophine est liée à l'incapacité des premiers de compenser la perte musculaire engendrée par la dégénérescence accélérée des myotubes, les auteurs de ce travail, des canadiens du Manitoba et de l'Ontario (Hamilton et Winnipeg), espèrent que les souris *MyoD*$^{-/-}$/*mdx* seront de bons modèles de la maladie humaine sur lesquels pourront être entreprises des études physiopathologiques et thérapeutiques [2].

[1. Pastoret C, Sebille A. *médecine/sciences* 1993; 9: 737-46.]

[2. Megeney LA, *et al. Genes Dev* 1996; 10: 1173-83.]