

## Identification et caractérisation d'un gène déterminant dans les amyotrophies spinales

Les amyotrophies spinales infantiles (*spinal muscular atrophy*, SMA) sont des maladies neuromusculaires, caractérisées par une dégénérescence des motoneurons de la moelle épinière qui entraîne une paralysie musculaire progressive. Ce sont les maladies héréditaires récessives autosomiques fatales les plus fréquentes après la mucoviscidose (incidence 1/6 000 naissances). Aucune thérapeutique curative n'existe à ce jour.

Selon l'âge au début des signes cliniques et leur évolutivité, on distingue trois types de SMA : le type I (la forme la plus sévère de la maladie de Werdnig-Hoffmann), le type II (ou forme intermédiaire) et le type III (la forme la plus modérée ou maladie de Kugelberg-Welander). Chez les enfants atteints du type I, les signes cliniques débutent dans les trois premiers mois de vie et sont caractérisés par une grande hypotonie ; les nourrissons n'acquiescent pas la station assise et l'évolution est sévère du fait d'une insuffisance respiratoire gravissime. Chez les enfants atteints du type II, les signes cliniques apparaissent plus tardivement : les enfants acquiescent la station assise mais non la marche, ce qui aboutit à un handicap moteur très sévère. Les enfants atteints du type III acquiescent la marche et, secondairement, ressentent une gêne croissante à courir puis à marcher. L'anomalie biochimique étant inconnue, la stratégie du clonage positionnel fut adoptée. La première étape consistait à localiser le gène sur une région chromosomique, puis à s'en rapprocher pour finalement l'identifier par l'observation de mutations présentes sur chacun des allèles portés par les sujets atteints et non présentes chez les sujets sains. En 1990, un groupe anglo-saxon et celui de Judith Melki et Arnold Munnich localisèrent le

gène responsable des trois formes de la maladie dans la région chromosomique 5q11.2-q13.3 [1-3]. Plusieurs groupes, dont le groupe parisien, entreprirent alors de se rapprocher de ce gène afin de l'identifier. D'une distance de plus de 9cM [4] entre les marqueurs encadrant le gène, l'équipe du CHU Necker-Enfants Malades réduisit cet intervalle à 4cM [5] puis à 2cM [6]. Ces résultats permirent alors de construire un *contig* de chromosomes artificiels de levure (YAC) couvrant cet intervalle à partir duquel purent être isolés de nouveaux marqueurs d'ADN très proches du gène. Cette étape révéla la présence de séquences répétées, très analogues et spécifiques de cette région. Une telle configuration de la région pouvait conférer une instabilité à l'origine de remaniements génomiques (délétions). Ainsi, une récente étude a montré l'existence de délétions de la région 5q13 chez un nombre élevé de sujets atteints de la forme sévère de la maladie [7].

L'observation de délétions spécifiques chez les malades fut un guide précieux pour cibler la recherche du gène responsable, car tout ou partie du gène se trouvait à l'évidence emporté par ces délétions [8]. Dès lors, une étude des plus petits remaniements fut entreprise, permettant un meilleur ciblage de la région candidate ; parallèlement était menée la recherche de gènes, candidats par leur position dans cette région. La mise en évidence d'une large duplication inversée d'un élément d'environ 500 kpb présente sur des chromosomes normaux rendit cette étape particulièrement complexe. Néanmoins, l'identification de marqueurs reconnaissant des *loci* spécifiques de l'un ou l'autre de ces éléments permit de positionner les délétions des malades dans l'élément télomérique de la duplica-

tion et de réduire la région critique à moins de 140 kpb. Un gène localisé dans cette région fut plus particulièrement étudié. Il est dupliqué, comme les autres marqueurs de la région, mais l'analyse comparative des séquences exoniques et des jonctions exon-intron permit de détecter cinq différences nucléotidiques entre les deux versions du gène, et donc de distinguer le gène centromérique du gène télomérique. L'analyse génétique d'une grande série d'individus sains ( $n = 246$ ) ou de parents de malades ( $n = 127$ ) montra que le gène télomérique était toujours présent et que 95 % des sujets portaient aussi le gène centromérique. Ces résultats ont suggéré que le gène télomérique était le gène ancestral et le gène centromérique sa copie. En revanche, l'analyse génétique de 229 malades de type I, II ou III montra que le gène télomérique (ancestral) était absent chez 213 malades (93 %). De plus, chez 13 malades (5,6 %) ce gène était interrompu entre les exons 7 et 8. Enfin, et surtout, chez les rares malades dont le gène télomérique n'était pas délété ( $n = 3$ ), on observait de très petites délétions emportant les sites consensus d'épissage des introns 6 et 7, ou une mutation ponctuelle, non retrouvées chez les témoins. Ces résultats permirent de conclure que le gène télomérique dénommé *SMN* (pour *survival motor neuron*) était le gène dont les mutations sont déterminantes dans l'apparition de la maladie. Ce gène code pour une protéine de petite taille (environ 32 kDa) sans homologie avec les protéines répertoriées dans les banques de données. Il s'agit donc d'une protéine jusque-là inconnue et d'expression ubiquitaire [9]. La présence d'une copie centromérique du gène, très similaire à *SMN*, amène à se demander pourquoi ce gène ne

semble pas pallier l'absence ou les mutations du gène *SMN* chez les malades. À l'inverse, l'absence du gène centromérique chez les individus sains, tous porteurs du gène *SMN*, n'entraîne pas l'apparition de la maladie. Une différence importante de fonction semble donc exister entre le gène centromérique et *SMN*. L'analyse de leurs transcrits a révélé l'existence d'un épissage alternatif de l'exon 7, spécifique du gène centromérique, aboutissant à un ARNm et à une protéine plus abondants chez les malades que chez les individus sains. On peut penser que cette protéine à l'extrémité C-terminale différente de celle de la protéine *SMN* est non fonctionnelle ou, au moins, fonctionnellement différente de *SMN* ou du produit entier du gène centromérique.

L'absence ou l'interruption du gène *SMN* chez 98 % des malades, quel que soit le type de la maladie, ne rend pas compte des différences cliniques qui existent entre une forme sévère et une forme modérée. Dans l'étude rapportée dans *Cell* [9], il est montré que chez les malades porteurs de la forme de type I, les délétions sont plus fréquentes et plus étendues que dans la forme modérée (type III). Ces délétions plus étendues pourraient emporter des éléments qui régulent l'expression de la copie centromérique analogue à *SMN*, ou emporter un autre gène proche du gène *SMN*.

Simultanément à l'équipe parisienne, Roy *et al.* ont identifié un gène appelé *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*), délété à l'état homozygote chez 17/38 (45 %) malades de type I, chez 13/72 (18 %) SMA de type II ou type III, mais aussi chez 3/168 (2 %) parents sains, suggérant que les mutations de ce gène sont responsables ou, plus probablement, contribuent au phénotype SMA [10]. Lefebvre *et al.* ont localisé le gène *NAIP* par rapport au gène *SMN*. *NAIP*, comme *SMN*, est dupliqué, et sa version télomérique est distale par rapport au gène *SMN*. Par sa position, *NAIP* pourrait être emporté dans les larges délétions observées chez les malades atteints de la forme sévère (type I) et non chez les malades atteints de la forme modérée (type III). Un autre gène

(*XSG3*), identifié par Thompson *et al.*, se trouve lui aussi être délété à l'état homozygote chez 58 % des malades atteints de la forme sévère, mais aussi chez deux parents sains [11]. Cette observation semble proche de celle faite avec le gène *NAIP*. Des investigations plus poussées sont donc nécessaires pour confirmer l'implication d'un gène « déterminant » et de gènes « modificateurs » dans l'apparition du phénotype « amyotrophie spinale ».

La capacité de détecter une anomalie moléculaire du gène *SMN* chez 98 % des malades permet désormais une confirmation diagnostique d'amyotrophie spinale. Aucun test biologique n'était jusqu'à présent disponible. Si la nature exacte des mécanismes génétiques qui concourent au phénotype sévère ou modéré de la maladie reste à éclaircir, l'identification du gène *SMN*, dont le rôle semble déterminant dans l'apparition de la maladie, ouvre de nombreuses perspectives. Elle permet de connaître la protéine en cause et d'analyser sa fonction et son mode d'action dans la survie des motoneurons. Ces étapes sont des préalables essentiels pour comprendre la physiopathologie de ces maladies et définir les stratégies pour pallier cette dégénérescence motoneuronale. À cet égard, l'obtention d'un modèle animal de la maladie humaine permettrait d'envisager des essais de correction du phénotype morbide.

**Lydie Bürglen  
Suzie Lefebvre  
Sophie Reboullet  
Olivier Clermont  
Philippe Burlet  
Louis Viollet  
Bernard Benichou,  
Corinne Cruaud  
Philippe Millasseau  
Massimo Zeviani  
Denis Le Paslier  
Jean Frézal  
Daniel Cohen  
Jean Weissenbach  
Arnold Munnich  
Judith Melki**

1. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LJI, Penschaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels RJ, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanova-Petrusewics I, Ott J, Munsat TL, Gilliam TC. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-q13.3. *Nature* 1990; 344: 540-1.
2. Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carrière JP, Fardeau M, Fontan D, Ponsot G, Billette T, Angelini C, Barbosa C, Ferrière G, Lanzi G, Ottoloni A, Babron MC, Cohen D, Hanauer A, Clerget-Darpoux F, Lathrop M, Munnich A, Frézal J. Gene for proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; 344: 767-8.
3. Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop M, Frézal J, Munnich A and the French spinal muscular atrophy investigators. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet* 1990; 336: 271-3.
4. Sheth P, Abdelhak S, Bachelot MF, Burlet P, Masset P, Hillaire D, Clerget-Darpoux F, Frézal J, Lathrop M, Munnich A, Melki J. Linkage analysis in spinal muscular atrophy by six closely flanking markers on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 764-8.
5. Melki J, Burlet P, Clermont O, Pascal F, Paul B, Abdelhak S, Sherrington R, Gurling H, Nakamura Y, Weissenbach J, Munnich A. Refined linkage map of chromosome 5 in the region of the spinal muscular atrophy gene. *Genomics* 1993; 15: 521-4.
6. Clermont O, Burlet P, Bürglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, Lathrop M, Munnich A, Melki J. Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 687-94.
7. Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. Délétions héréditaires et *de novo* de la région 5q13 dans les amyotrophies spinales infantiles. *médecine/sciences* 1994; 10: 889-91.
8. Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. *De novo* and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 1994; 264: 1474-7.
9. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy determining gene. *Cell* (sous presse).
10. Roy N, Mahadevani M, McLean M, Shuttler G, *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), a novel protein with homology to baculoviral inhibitors of apoptosis, is partially deleted in individuals with type 1, 2 and 3 spinal muscular atrophy. *Cell* (sous presse).
11. Thompson T, DiDonato C, Simard L, *et al.* A novel cDNA detects homozygous microdeletions in greater than 50 % of type 1 spinal muscular atrophy patients. *Nature Genet* 1995 (sous presse).

**Lydie Bürglen, Suzie Lefebvre,  
Sophie Reboullet, Olivier  
Clermont, Philippe Burlet, Louis  
Viollet, Bernard Benichou,  
Massimo Zeviani, Jean Frézal,  
Arnold Munnich, Judith Melki**

*Unité de Recherches sur les Handicaps  
Génétiques de l'Enfant, Inserm  
U. 393, Institut Necker, Hôpital des  
Enfants Malades, 75743 Paris Cedex  
15, France.*

**Corine Cruaud, Jean Weissenbach**  
*Généthon, 91002 Évry Cedex, France.*

**Philippe Millasseau, Denis Le  
Paslier, Daniel Cohen**

*Centre d'Études du Polymorphisme  
Humain (CEPH), 27, rue Juliette  
Dodu, 75010 Paris, France.*

#### **Remerciements**

Nous remercions les malades, les familles et les médecins qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Nous remercions V. Raclin, N. Giga-rel, M. Berthelon (Inserm U. 393) et J.F. Prudhomme (Généthon) pour leur assistance technique. Ces travaux ont bénéficié du soutien de l'Association Française contre les Myopathies (AFM), du Groupement de Recherches et d'Études sur les Génomes (GREG), la Fondation de France, la Fondation Paribas, le SESEP, le Fonds d'Études et de Recherche du Corps médical des Hôpitaux de Paris et de l'Assistance Publique, Hôpitaux de Paris.