

## Génomome nucléaire et maladies mitochondriales : l'exemple du syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh, encéphalopathie nécrosante subaiguë, est une des plus fréquentes maladies mitochondriales de l'enfant. Elle se caractérise par des lésions cérébrales nécrotiques, bilatérales et symétriques, s'accompagnant de prolifération vasculaire avec perte de neurones, démyélinisation et formation de cavités kystiques. Hétérogène sur le plan clinique, elle l'est aussi génétiquement. Elle est la conséquence d'un déficit de la chaîne respiratoire, mais n'est pas obligatoirement due à une mutation de l'ADN mitochondrial.

### Les cinq complexes de la chaîne respiratoire

L'organisation moléculaire de la chaîne respiratoire dépend en effet de gènes mitochondriaux et de gènes nucléaires. Certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire dépendent du génome mitochondrial (d'hérédité purement maternelle), mais la majeure partie est codée par des gènes nucléaires, de transmission mendélienne. Sur le génome nucléaire, outre des gènes de structure, se trouvent aussi tous les gènes qui participent à l'importation, l'assemblage, la fonction des complexes, ainsi que ceux qui assurent le maintien, la propagation et l'expression du génome mitochondrial. On imagine donc l'extrême hétérogénéité génétique potentielle de ce syndrome de Leigh dans lequel tous les modes de transmission sont observés. La forme liée à l'X, qui est rare, est attestée par l'existence, dans une famille, d'une mutation ponctuelle d'un gène porté par l'X et codant pour la sous-unité E1 $\alpha$  de la pyruvate déshydrogénase. Dans une forme récessive, chez une famille étudiée par Rustin *et al.* [1] à l'Hôpital des Enfants malades (Paris), un autre

gène nucléaire, codant pour la sous-unité flavoprotéique de la succinate déshydrogénase [2] entraîne une atteinte du complexe II. Dans le génome mitochondrial, certaines mutations ont été observées (dans le complexe I entre autres).

### La quête du gène à l'origine du déficit en COX

La forme la plus fréquente, récessive autosomique, est toutefois due à une déficience en cytochrome c oxydase, ou COX, complexe IV de la chaîne respiratoire. Ce déficit est identifiable biochimiquement, principalement dans deux formes cliniques, la forme classique, et une forme décrite au Québec dans la région du Lac Saint Jean-Saguenay [3]. L'analyse des 13 sous-unités du complexe n'a révélé aucune mutation pathogène. Cette constatation est donc en faveur d'une atteinte de gènes nucléaires. L'hypothèse vient d'être confirmée, car une étude de complémentation récente démontre que les hybrides, réalisés à partir de fibroblastes de malades, récupèrent la fonction COX grâce uniquement à un apport nucléaire, l'apport mitochondrial restant sans effet. Fait encore plus important, les huit cas analysés font partie du même groupe de complémentation, ce qui laisse supposer qu'un seul gène est impliqué dans la forme classique [4]. Parmi les innombrables gènes disséminés sur le génome dont on ne connaît encore ni le nombre ni l'identité, comment trouver une stratégie pour dépister le ou les gènes responsables, d'autant plus que la petite taille des familles ne permet pas d'effectuer d'analyses de liaison valables ?

Si, pour la forme franco-canadienne, un gène a pu être situé sur le chromosome 13 grâce à la forte endoga-

mie de cette population, on n'espérerait pas de sitôt découvrir le gène de la forme classique. C'est pourtant ce que vient de réussir une équipe canadienne qui a pu non seulement localiser le gène, mais encore l'identifier [5]. Ce beau résultat tient d'abord au choix de la technique (et leur travail pourra servir d'exemple à d'autres chercheurs) et ensuite à une once de chance, comme nous allons le constater.

### Le transfert par *microcell* d'hybrides monochromosomiques

La méthode choisie est le transfert de chromosomes par *microcell*, mise à la disposition des chercheurs depuis 1995, grâce à la constitution d'un ensemble d'hybrides homme-souris, dont chaque lignée ne contient qu'un seul chromosome humain, les autosomes de 1 à 22, plus un hybride avec l'X [6]. Mais son utilisation nécessite un travail considérable qui a peut-être, jusqu'à présent, limité les tentatives. Il faut en effet transférer chacune de ces lignées hybrides monochromosomiques dans des fibroblastes de malades pour trouver quel est le chromosome humain qui assure la complémentation. Après avoir analysé la fonction COX de chacune des cultures de fibroblastes d'un malade ayant reçu un par un tous les chromosomes humains, les chercheurs canadiens purent constater que, seule, la culture portant le chromosome 9 avait une activité COX spécifique restaurée. L'expérience fut alors répétée sur des fibroblastes provenant d'autres malades avec des résultats semblables. Pour affiner la région correctrice (c'est-à-dire porteuse du gène déficient chez les malades), des *microcell* ne contenant que des fragments du chromosome 9 furent transférés. La plus

petite région permettant une complémentation fut délimitée en 9q43.

### Un travail déjà tout mâché

C'est à partir de ce stade que l'équipe a bénéficié d'une double chance: 1) lors de la traque du gène *TSCI* dont les mutations sont responsables de la plupart des cas de la sclérose tubéreuse, la région avait été entièrement séquencée sur 1,4Mb. Parmi les trente gènes de la région candidate se trouvait le groupe des gènes *SURFEIT*, gènes de ménage au nombre de six (de *SURF1* à *SURF6*) qui avaient retenu l'attention en raison de leur disposition en « cluster » (ils sont tous très proches les uns des autres) et parce qu'ils sont très conservés dans l'évolution. On les retrouve chez les oiseaux, (qui ont divergé des mammifères depuis 600 millions d'années). 2) Parmi ces six gènes *SURF*, le gène *SURF1* se présentait comme un candidat privilégié car son homologue chez la levure, *SHY1* restaure l'activité COX du mutant *pet*, et code pour une protéine nécessaire à l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il fut donc étudié en priorité. De fait, l'ADNc de *SURF1* restaure l'activité COX dans les fibroblastes de malades. La comparaison des séquences protéiques prédites entre la levure, le poisson *Fugu rubripes*, la souris et l'homme montre une grande conservation, surtout dans les

domaines transmembranaires. Enfin, preuve supplémentaire si besoin était, cinq mutations différentes devant entraîner une protéine tronquée ont été trouvées dans les allèles de malades appartenant à trois familles non apparentées.

### L'énigme de l'atteinte sélective du système nerveux

Par conséquent, les malades atteints de forme classique de syndrome de Leigh avec déficience COX, qui appartiennent pour la plupart au même groupe de complémentation, sont très probablement porteurs d'une mutation du gène *SURF1*, en l'absence de toute atteinte des sous-unités de structure du complexe COX. Le gène en cause dans la forme québécoise devrait aussi pouvoir être isolé par cette même méthodologie, ainsi que les cas dus à une déficience du complexe I et le syndrome de déplétion de l'ADNmt. On ignore encore le rôle précis du gène *SURF1*. Il pourrait coder pour un facteur d'assemblage ou de maintenance spécifique du complexe COX chez l'homme. Il reste à comprendre comment une déficience d'un gène ubiquitaire provoque cette atteinte sélective du tissu nerveux, phénomène observé dans d'autres maladies neurodégénératives. Récemment une enzyme de la famille des protéases AAA (codées chez la levure par des gènes mitochondriaux), la paraplégine, a été trouvée impli-

quée dans une paraplégie spastique héréditaire, caractérisée par une dégénérescence des axones de la moelle épinière [7]. L'étude de ces nouvelles classes de gènes intervenant chez l'homme dans des désordres neurodégénératifs est ouverte et risque d'être fort intéressante.

S.G.

1. Rustin P, Munnich A, Rötig A. Dix ans d'exploration des maladies mitochondriales: une collaboration modèle entre chercheurs et cliniciens. *Med Sci* 1996; 12 (suppl n° 10): 37-43.
2. Bourgeron T, Rustin P, Chrétien D, et al. Mutation of a nuclear succinate deshydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; 11: 144-9.
3. Lee N, Morin C, Mitchell G, Robinson BH. Saguenay Lac Saint Jean cytochrome oxidase deficiency: sequence analysis of nuclear encoded COX subunits, chromosomal localization and anomaly in subunit VIc. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1406: 1-4.
4. Munaro M, Tiranti V, Sandona D, Lamantea E, Uziel G, et al. A single cell complementation class is common to several cases of cytochrome c oxidase-defective Leigh's syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 221-8.
5. Zhu Z, Johns T, Fu I, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 1998; 20: 337-43.
6. Cuthbert AP, Trott DA, Ekong RM, et al. Construction and characterization of a highly stable human: rodent monochromosomal hybrid panel for genetic complementation and genome mapping studies. *Cytogenetic Cell Genet* 1995; 71: 68-76.
7. Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, et al. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 1998; 93: 973-83.

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Un pas vers le traitement par transfert de gène de déficits immunitaires combinés sévères? (suite).** En 1998, Alain Fischer rapportait dans ces colonnes les travaux de Bunting et al. (Memphis, TN, USA) sur la correction du déficit immunitaire par thérapie génique chez des souris immunodéficientes par déficit en JAK-3: l'injection de progéniteurs hématopoïétiques infectés par un vecteur rétroviral contenant le gène de JAK-3 (*m/s* 1998, n° 4, vol. 14, p. 510). On observait un avantage sélectif des lymphocytes

transduits, leur proportion étant très supérieure à celle des autres cellules myéloïdes transduites. Aujourd'hui sur le même modèle, l'équipe de Bunting rapporte les capacités immunitaires retrouvées chez les souris ayant subi une thérapie génique de JAK-3 après infection par le virus Influenza A, léthal chez les souris non traitées [1]. Non seulement les souris survivent mais l'importance de leur réaction immunitaire est tout à fait comparable à celle des souris témoins normales: elles produisent des immu-

noglobulines spécifiques du virus et ont une réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> normale. Elles survivent à 90 %. L'avantage sélectif des lymphocytes transduits est confirmé. Enfin, la présence d'un petit nombre de cellules semble suffisante pour guérir les troubles immunitaires, ce qui augure bien d'une possible application à l'homme.

[1. Bunting KD, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 232-7.]