

***L* la maladie de Wilson : le gène en cause est similaire au gène responsable de la maladie de Menkes**

Dans les numéros de décembre 1993 de *Nature Genetics* [1-3] et de *Biochemical and Biophysical Research Communications* [4], trois groupes ont rapporté l'identification du gène responsable de la maladie de Wilson. Comme cela avait été prédit (*m/s*, n° 3, vol. 9, p. 316), il s'agit d'un gène qui code pour un nouveau transporteur de cuivre appartenant à la famille des ATPases de type P, similaire au gène responsable de la maladie de Menkes [5-7].

Le cuivre est considéré comme un oligo-élément indispensable à toute forme de vie. En effet, des enzymes telles que la cytochrome c oxydase, la superoxyde dismutase, la tyrosinase, la dopamine β hydroxylase, la lysyl oxydase utilisent les ions Cu^{2+} comme co-facteurs. En excès, le cuivre est aussi un ion très toxique, capable d'oxyder les protéines et les lipides membranaires, de se lier aux protéines et aux acides nucléiques et, enfin, de favoriser la production de radicaux libres. Les différents organismes vivants doivent donc être dotés de mécanismes efficaces et adéquats leur permettant d'assurer l'homéostasie et le transport de ce métal lourd essentiel et de lutter contre les effets toxiques d'un éventuel excès des ions cuivre.

Actuellement, on connaît au moins deux maladies héréditaires dues à des anomalies du métabolisme du cuivre : la maladie de Menkes et sa forme allélique moins sévère, le *cutis laxa* lié à l'X, et la maladie de Wilson. La maladie de Menkes (*Tableau I*) [8] est caractérisée par une dysmorphie, une dégénérescence neurologique associée à un retard mental, un état particulier des cheveux qui sont dépigmentés et

crêpelés, un déficit des parois vasculaires et une évolution rapide vers une mort précoce (en général avant l'âge de 5 ans). La majorité de ces signes cliniques pourrait être expliquée par les déficits en enzymes dont l'activité nécessite les ions cuivre. L'hypothèse, proposée depuis plusieurs années, selon laquelle le défaut primaire affecterait une protéine impliquée dans le transport intracellulaire du cuivre [8, 9], a été étayée par l'identification du gène responsable de la maladie de Menkes, rapportée par Vulpe *et al.* [5], Chelly *et al.* [6], Mercer *et al.* [7]. Ces derniers travaux ont révélé que le produit du gène de Menkes serait un transporteur de cuivre, membre de la famille des ATPases de type P, dont le domaine N-terminal, formé de six répétitions de 23 acides aminés contenant chacune le motif Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys (X étant n'importe quel acide aminé), est vraisemblablement impliqué dans la liaison du cuivre (*m/s*, n° 3, vol. 9, p. 316). Une localisation de la protéine du gène de Menkes au niveau du réticulum endoplasmique a été suggérée par les études immunocytochimiques rapportées récemment par J. Gitlin (résultats non publiés). Cette protéine serait donc impliquée dans la livraison du cuivre aux protéines nouvellement synthétisées.

La première description clinique de la maladie de Wilson (dégénérescence hépato-lenticulaire autosomique récessive, *Tableau I*) [8] a été rapportée en 1912 par Kinnear-Wilson. Les corrélations entre les effets toxiques de l'accumulation du cuivre dans le foie et le cerveau et les signes cliniques de la maladie ont été décrites durant les années

1940. Cependant, malgré une compréhension limitée des mécanismes de transport et du métabolisme du cuivre, un traitement efficace utilisant des agents chélateurs comme la pénicillamine a été introduit par Walshe en 1956. Bien que le déficit primaire n'ait pas été connu, des études biochimiques avaient suggéré que la pathogénie de la maladie de Wilson serait caractérisée par deux perturbations fondamentales du métabolisme du cuivre : une réduction du taux d'incorporation du cuivre au niveau de la céruloplasmine, associée à une réduction de l'excrétion biliaire du cuivre. Ce dernier défaut serait responsable de l'accumulation du cuivre dans le foie et de la dégénérescence hépato-lenticulaire progressive. Ultérieurement, le dépôt du cuivre dans le cerveau et la cornée entraîne respectivement une perte de la coordination des mouvements et la formation des anneaux de Kayser-Fleischer. Par ailleurs, l'accumulation du cuivre dans d'autres tissus pourrait entraîner des troubles variés tels une perturbation tubulaire rénale, une ostéoporose, une arthropathie, une cardiomyopathie ou un hypoparathyroïdisme.

L'identification du gène responsable de la maladie de Menkes et son expression dans tous les tissus sauf le foie, dans lequel le niveau d'expression est très réduit, avaient suggéré que la maladie de Wilson était due, elle aussi, au défaut d'un transporteur du cuivre, spécifique du foie dans ce cas. Utilisant des approches similaires de clonage positionnel, cette hypothèse a été récemment confirmée de manière indépendante par les groupes de

Tableau I		
COMPARAISON DES MALADIES DE MENKES ET DE WILSON		
	Maladie de Menkes	Maladie de Wilson
Localisation	Xq13.3/récessive	13q14.3/récessive
Données cliniques	Début à la naissance Dysmorphie, retard mental Dégénérescence neurologique Cheveux dépigmentés et crépelés Déficit des parois vasculaires Évolution grave et rapide Mort précoce (en général avant 5 ans)	Début durant l'enfance Dégénérescence hépatolenticulaire progressive Mouvements involontaires Ostéoporose, arthropathie Anneaux de Kayser-Fleischer Atteinte rénale Cardiomyopathie
Données biologiques	Baisse de la cuprémie Baisse du taux de la céruloplasmine plasmatique Baisse du taux du Cu dans le foie	Augmentation de la cuprémie Augmentation du taux de la céruloplasmine plasmatique Augmentation de la cuprurie Accumulation du Cu dans le foie
Culture cellulaire	Accumulation intracellulaire du Cu par défaut de relargage	Normal dans la majorité des cas
Pathogénie	Défaut d'absorption intestinale du Cu	Diminution de l'excrétion biliaire et de l'incorporation dans la sidéropasme du Cu
Traitement	Pas de traitement efficace	Agents chélateurs: pénicillamine et sels de zinc
Modèles animaux	<i>Mottled mouse</i> (mo)	<i>toxic milk mouse</i> (tx) Chien terrier Bedlington
Produit du gène	ATPase de type P Transporteur de cuivre	ATPase de type P Transporteur de cuivre (60 % d'identité avec le gène Menkes)
Expression	Tous les tissus sauf le foie	Foie, rein et placenta
Mutation	16 % de délétions	Mutations ponctuelles Petites délétions

Cox (Toronto, Canada) [1], Tanzi (Boston, MA, USA) et Gilliam (New York, NY, USA) [2, 3], et Gitlin, (Saint-Louis, MO, USA) [4], dont le père avait décrit en 1952 le déficit en céruloplasmine associé à la maladie de Wilson [10].

Des études de génétiques de liaison publiées en 1985 avaient montré que le *locus* de la maladie de Wilson ségrégeait avec une enzyme érythrocytaire, l'estérase D, localisée sur le chromosome 13 [11]. Ulté-

rieurement, le *locus* fut assigné à une région génomique flanquée par les marqueurs d'ADN proximal D13S31 et distal D13S59. L'établissement d'une carte physique et le clonage de la région d'intérêt, utilisant des banques génomiques spécifiques du chromosome 13, avaient permis l'isolement de marqueurs microsatellites physiquement ordonnés, et conduit à l'identification d'haplotypes spécifiques de la maladie de Wilson [12]. Afin d'isoler

l'ADNc du gène responsable de la maladie de Wilson, Bull *et al.* [1] utilisèrent comme sonde un fragment d'ADNc du gène de Menkes correspondant au domaine potentiel de liaison du cuivre. Les clones de YAC et de cosmides spécifiques du chromosome 13 contenant des séquences homologues à ce domaine furent identifiés après hybridation à faible stringence. Par la suite, des expériences de sélection d'ADNc permirent d'isoler des clo-

nes d'ADNc localisés dans la région correspondant au *locus* de la maladie de Wilson et dont la séquence était similaire à celle du gène de Menkes. Tanzi *et al.* [2] se servirent d'un oligonucléotide dégénéré, correspondant à une séquence de liaison des métaux lourds, décrite dans le précurseur de la protéine β amyloïde [12], pour identifier un clone d'ADNc de cerveau produit par la région génomique d'intérêt. Yamaguchi *et al.* [4], enfin, employèrent aussi l'hybridation à faible stringence pour isoler un clone d'ADNc de foie similaire à la partie 5' du gène de Menkes.

L'ARNm, d'environ 7,5 kb, produit par le gène responsable de la maladie de Wilson est exprimé essentiellement dans le foie, le rein [1, 4] et le placenta [2]. Le transcrit a été aussi détecté, mais à un niveau beaucoup plus faible, dans le cœur, le cerveau, le poumon, le muscle et le pancréas. L'étude du gène et de son transcrit chez les patients a révélé cinq mutations spécifiques de la maladie : deux transversions, une délétion et une insertion d'une paire de nucléotides [2, 3], et une délétion de sept paires de nucléotides [1].

La séquence nucléotidique de l'ADNc, obtenue par Cox *et al.*, a permis de prédire que le transcrit code pour une protéine de 1411 acides aminés. Il s'agit d'un nouveau transporteur de cations, membre de la famille des ATPases de type P, très similaire au produit du gène de Menkes [1, 2]. Le niveau global d'identité entre les produits des gènes de Wilson et de Menkes est de l'ordre de 56 %, mais un niveau supérieur d'identité a été observé dans les domaines de déphosphorylation (78 %), transduction-phosphorylation (89 %), liaison de l'ATP (79 %) (*m/s*, n° 3, vol. 9, p. 316). Quant au domaine N-terminal, qui contient les six motifs potentiels de liaison du cuivre, son niveau d'identité entre les produits des deux gènes est de l'ordre de 65 %. Par ailleurs, l'analyse de la séquence peptidique du gène de Wilson a révélé aussi des différences

de structure potentielles, telles que la présence d'une courte séquence hydrophobe proche du quatrième motif de liaison du cuivre.

L'ensemble des données rapportées dans les références [1-8] montre donc que les gènes responsables des maladies de Menkes et de Wilson codent pour des transporteurs de cations appartenant à la même famille, vraisemblablement impliqués dans le transport du cuivre. Bien que très significatives, ces données ne permettent pas encore de comprendre de manière satisfaisante les relations entre les déficits primaires et la physiopathologie de chacune de ces deux maladies. Apparemment, l'absence d'un gène de Menkes fonctionnel entraîne essentiellement un défaut d'absorption intestinale du cuivre, associé, d'une part à l'accumulation intracellulaire de cet élément, sous sa forme non toxique, dans tous les tissus de l'organisme, sauf le foie, et, d'autre part, à un déficit en enzymes qui utilisent les ions Cu^{2+} comme co-facteurs. Au contraire, l'absence de gène de Wilson fonctionnel entraîne la réduction de l'excrétion biliaire du cuivre et de l'incorporation de ce métal dans la céruloplasmine, associée à une accumulation du cuivre, sous sa forme toxique, dans plusieurs tissus essentiels. Bien que les données préliminaires concernant les profils d'expression des deux gènes et la localisation de la protéine du gène de Menkes puissent clarifier certaines questions, seules des études fonctionnelles détaillées, immunocytologiques et toxicologiques, pourront nous éclairer sur les mécanismes de transport du cuivre, non seulement intracellulaire, mais aussi entre les différents tissus. L'exploration de modèles animaux, tels que la souris *mottled* (mutation *mo*) équivalente à la maladie de Menkes, la souris *toxic milk* (mutation *tx*), le chien terrier Bedlington et le rat LEC, équivalents à la maladie de Wilson, devrait aider à élucider les mécanismes impliqués dans le métabolisme du cuivre et fournir des modèles adéquats pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

Parmi les ATPases de type P des eucaryotes, seuls les produits des gènes responsables des maladies de Menkes et de Wilson sont connus pour leur implication dans le transport des métaux lourds. Les protéines ATPases de type P possèdent toutes un résidu aspartate qui est transitoirement phosphorylé à partir d'ATP durant le cycle de transport du cation, d'où le nom ATPase de type P. Les protéines codées par les gènes de Menkes et de Wilson partagent une analogie de structure avec plusieurs opérons de résistance aux métaux lourds tels que la *CadA* ATPase de *Staphylococcus aureus* et la Cu^{2+} ATPase *Cop B* d'*Enterococcus hirae*, non seulement dans les domaines communs à toutes les protéines ATPases de type P, mais aussi dans le domaine dithiol N-terminal qui est supposé contenir les motifs de liaison des métaux lourds [14]. La conservation de ces ATPases transporteurs de métaux lourds chez des organismes aussi divergents que les bactéries fournit des possibilités intéressantes pour l'étude fonctionnelle des différentes régions des protéines codées par les gènes de Menkes et de Wilson ■

Jamel Chelly

Institute of Molecular Medicine, Human Genetics Laboratory, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DV, UK.

RÉFÉRENCES

1. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet* 1993; 5 : 327-37.
2. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, *et al.* The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet* 1993; 5 : 344-50.

-
3. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, *et al.* Mapping, cloning and genetic characterization of the Wilson disease gene. *Nature Genet* 1993; 5: 338-43.
 4. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of human liver cDNA as a candidate gene for the Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 271-7.
 5. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet* 1993; 3: 7-13.
 6. Chelly J, Tümer Z, Tønnesen T, *et al.* Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet* 1993; 3: 14-9.
 7. Mercer LFB, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhawe M, Siemiński D, Glover TW. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature Genet* 1993; 3: 20-5.
 8. Dankes DM. In: Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *Metabolic basis of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1989: 1411-31.
 9. Herd SM, Camakaris J, Christofferson R, Wookey P, Danks DM. Uptake and efflux of copper-64 in Menkes' disease and normal continuous lymphoid cell lines. *Biochem J* 1987; 247: 341-7.
 10. Scheinberg IH, Gitlin D. Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science* 1952; 116: 484-5.
 11. Frydman M, Bonnè-Tamir B, Farrer LA, *et al.* Assignment of the gene for Wilson disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1819-21.
 12. Thomas GR, Roberts EA, Rosales TO, *et al.* Allelic association and linkage studies in Wilson disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1401-5.
 13. Bush AI, Pettingell W, Wasco W, Tanzi RE. Zinc-induced precipitation of β 4A is prevented by copper. *Soc Neurosci Abs* 1993; 19: 19.
 14. Silver S, Nucifora G, Phung LT. Human Menkes X chromosome disease and the staphylococcal cadmium-resistance ATPase: a remarkable similarity in protein sequence. *Mol Microbiol* 1993; 10: 7-12.

TIRÉS A PART

J. Chelly.