

## **L**e gène de la myopathie de Duchenne : la chasse aux exons est ouverte

Le numéro de *médecine|sciences* de décembre 1985 (vol. 1, p. 442) rapportait le progrès décisif accompli par L. Kunkel et son équipe du Children's Hospital à Boston qui avaient cloné des fragments d'ADN du chromosome X, les sondes pERT 87, capables de reconnaître des délétions chez environ 10% des malades atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) [1]. Avec ces sondes, on pouvait estimer être arrivé à proximité du gène DMD. Un article paru dans la revue *Nature* datée du 3 juillet 1986 [2] démontre que les sondes pERT 87 ne sont pas à côté du gène DMD mais dans le gène lui-même, et que les dimensions de ce dernier sont considérables. Grâce à une action de coopération internationale sans précédent [3], regroupant 25 laboratoires ayant étudié l'ADN de myopathes avec les sondes pERT 87.1, 8 et 15, cet article présente le bilan d'une recherche systématique de délétion. Sur les 1346 myopathes non apparentés étudiés, 88, soit 6,5%, ont été trouvés porteurs d'une délétion reconnaissable par les sondes pERT [2]. C'est en précisant et en comparant l'étendue de ces délétions que Kunkel est arrivé aux conclusions suivantes : (a) il n'y a pas deux délétions identiques; (b) certaines délétions sont très grandes (> 140 kb), d'autres plus limitées (la plus petite connue fait tout de même 45 kb); (c) les délétions observées touchent soit la totalité, soit une partie du domaine déjà cloné par Kunkel

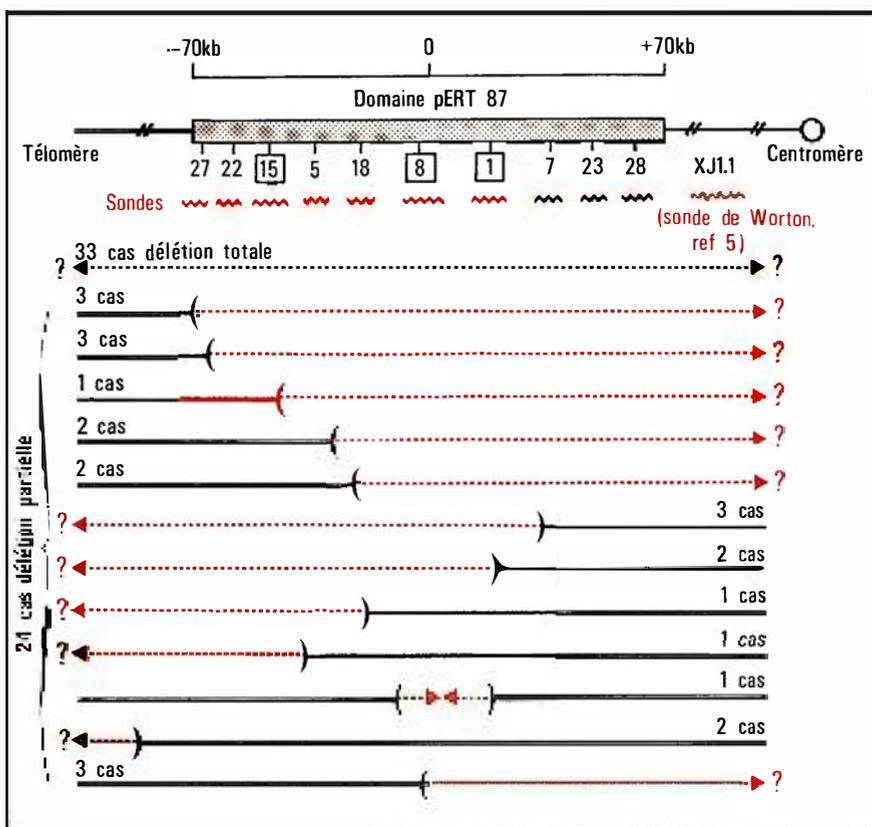
(140 kb); (d) la comparaison des domaines délétés ne permet pas de délimiter un plus petit commun dénominateur (*figure 1*). Autrement dit, il existe des délétions limitées, soit à droite, soit à gauche du site reconnu par pERT 87.8 pris comme point de référence, et elles s'accompagnent d'un syndrome clinique indistinguable de celui qui est observé dans les délétions totales. Ceci signifie que Kunkel a fait mouche dès le début, et que les sondes pERT 87 sont dans le gène. Le problème n'est donc plus de « marcher » vers le gène DMD à partir des sondes pERT 87, mais de « marcher » dans les deux sens pour en retrouver les extrémités 5' et 3'. A l'heure actuelle, une zone de plus de 600 kb a été explorée par Kunkel, sans que les limites du gène semblent avoir été atteintes, ce qui en ferait le plus long gène connu. En fait il y a peut-être plus d'un seul gène en cause, mais, qu'il s'agisse d'une poussière d'exons sur un seul gène gigantesque ou de deux gènes contigus de dimension tout de même considérable, le problème n'est pas fondamentalement différent. D'autres faits sont troublants : l'existence de recombinaisons entre les sites pERT et les sites de mutation DMD, dans les formes non délétionnelles, indiquant une distance génétique de 6 centimorgans [4]. Cette distance est considérable et ne peut correspondre à une réalité physique (le gène aurait alors 6 millions de paires de bases!). Il est probable qu'à l'énormité du

gène se surajoute un *hot spot* de recombinaison, qui pourrait bien expliquer l'extraordinaire fréquence des néo-mutations dans cette région du génome (1/3 des cas de myopathie de Duchenne sont dus à des événements mutationnels *apparus de novo*).

D'autre part, il semble que l'ordre du gène DMD et des loci spécifiés par les différentes sondes ne soit pas immuable et que des inversions soient possibles.

Puisqu'avec les sondes pERT 87 on est « dans » le gène, où est-il? Pour le savoir il faut repérer les séquences codantes. Jusqu'à présent, la recherche de produits d'expression (ARN messagers) est demeurée vaine, et une stratégie inhabituelle a été adoptée, visant à découvrir directement sur les 400 kb d'ADN déjà clonés des séquences pouvant représenter des exons. Les candidats retenus doivent obéir aux critères suivants : (a) être des séquences uniques très conservées dans le règne animal (on sait que les exons divergent beaucoup moins vite que les introns); (b) comporter un cadre de lecture ouvert (c'est-à-dire une séquence ininterrompue de codons signifiants); (c) être borné par des séquences consensus d'épissage; (d) permettre en fin de compte de révéler un ARN messager par la technique de *Northern*.

On mesure l'énormité de la tâche s'agissant d'un domaine pouvant dépasser 600 kb! Pourtant, au récent Symposium de Cold Spring Harbor sur la Biologie Moléculaire



## Dernière heure!

Figure 1. **Pathologie moléculaire de la région pERT 87 dans 57 cas de DMD avec délétion infra-microscopique** [2].

- ▬ : domaine de l'ADN couvert par les sondes pERT;
- ? <-----> ? : délétion non délimitée débordant le domaine pERT;
- (-----> ? : délétion délimitée du côté distal;
- ? <-----) : délétion délimitée du côté proximal;
- (-----<-----) : délétion délimitée des deux côtés.

d'Homo Sapiens (28 mai-4 juin 1986), Kunkel d'une part, et Worton (Toronto) d'autre part ont fait état de résultats préliminaires indiquant que des séquences obéissant aux critères (a), (b), (c) et peut-être même (d), ci-dessus définis, auraient été identifiées. A partir de là, les choses pourraient aller très rapidement vers l'identification du message protéique. Même si le « gène » DMD doit nous réserver encore des surprises, on peut légitimement espérer l'identifier dans un avenir proche, et résoudre enfin l'une des plus cruelles énigmes de la médecine. J.-C. K.

1. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, et al. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985; 316: 842-5.
2. Kunkel LM, et 75 co-auteurs. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986; 322: 73-7.
3. Goodfellow PN. Duchenne muscular dystrophy, collaboration and progress. *Nature* 1986; 322: 12-3.
4. Fishbeck K H, Ritter AW, Tirschwell DL, et al. Recombination with pERT 87 (DXS 164) in families with X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1986; ii: 104.
5. Ray PN, Belfall B, Duff C, et al. Cloning of the breakpoint of an X; 21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1985; 318: 672-5.

A l'occasion de la communication qu'il a faite le 30.9.86 au deuxième colloque national sur les maladies neuromusculaires organisé à Tours par l'Association des Myopathes de France, Anthony P. Monaco, de l'équipe de L. Kunkel, vient de révéler la teneur d'un article à paraître dans la revue *Nature* datée du 16.10.86 (Monaco A P, Neeve R L, Coletti-Feener C, Bertelson C J, Kurnit D M, Kunkel L M. Isolation of candidate cDNA's for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene). Grâce à deux séquences génomiques très conservées, utilisées comme sondes dans une expérience de type *Northern*, ces auteurs ont détecté dans des tissus fœtaux humains (muscle, intestin grêle, poumon) un ARN messager géant de 16 kb. Celui-ci correspond à la juxtaposition d'une centaine de très court exons (en moyenne 160 paires de bases) occupant sur le génome un espace de 1600 kb! On est donc rentré dans la deuxième phase, dite de « l'après-gène », où la séquence de la protéine sera rapidement reconstituée (5000 amino-acides), et sa fonction et son lieu d'expression élucidées. Parallèlement, l'étude de la pathologie moléculaire des myopathies de Duchenne et de Becker entre dans une phase nouvelle qui doit déboucher sur une compréhension de la physiopathologie, préalable indispensable à toute thérapie raisonnée. J.-C. K.