

Mécanismes moléculaires des enzymopathies génétiques

Les mécanismes des maladies héréditaires sont remarquables en ce que toute cause possible du déficit en une activité biologique a été (le plus souvent) ou sera (probablement) rencontrée dans la nature, et particulièrement chez l'homme. L'utilisation de la technologie des recombinants d'ADN permet de déterminer de plus en plus aisément les causes génétiques des affections héréditaires ; elle permet d'entrevoir aussi, maintenant, les stratégies qui pourront être utilisées pour proposer un traitement adapté de ces maladies, traitement qui devra être éthiquement acceptable, et limiter au maximum l'incertitude quant aux conséquences possibles des techniques utilisées.

Jean-Claude Dreyfus

RÉFÉRENCES

1. Dreyfus JC. Bases moléculaires des maladies génétiques enzymatiques. *Biochimie* 1972 ; 54 : 559-71.
2. Dreyfus JC, Poenaru L. Alpha-glucosidases in white blood cells with reference to the detection of acid 1-4 glucosidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1978 ; 85 : 615-22.

ADRESSE

J.-C. Dreyfus : professeur honoraire de biochimie médicale à l'université Paris V. Inserm U. 129, CHU Cochin-Port-Royal, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

m/s n° 2 vol. 5, février 89

La compréhension des mécanismes des maladies héréditaires monogéniques, préluce indispensable à celle des affections plus complexes, a fait récemment d'énormes progrès avec l'accès direct à l'analyse des gènes. Des retombées cliniques sont apparues, tel le diagnostic prénatal, et des possibilités thérapeutiques se profilent à un horizon qui est, peut-être, désormais proche. La molécule phare, qui a bénéficié de progrès dans les connaissances précédant toutes les autres, est restée l'hémoglobine ; mais comme elle est de loin la mieux connue, nous orienterons surtout ce travail sur les connaissances acquises en enzymologie.

La notion d'erreur innée du métabolisme a été proposée par Garrod au début du XX^e siècle. Après la première description, par C. et G.T. Cori en 1950, du déficit en glucose-6-phosphatase, les exemples d'enzymopathies se sont multipliés. Le

concept de gène régulateur, popularisé par les travaux de Jacob et Monod sur les bactéries, n'a pas jusqu'à présent fait sa preuve en pathologie, et on a pu montrer que la majorité des déficits trouvait son origine dans des altérations des gènes de structure, dont l'élucidation se poursuit à une cadence accélérée. La localisation chromosomique des gènes se fait également à un rythme croissant, en combinant les méthodes de liaison génique — employant pour cette recherche, de plus en plus souvent, des sondes anonymes —, l'hybridation cellulaire somatique, l'hybridation moléculaire *in situ*. Les maladies enzymatiques génétiques sont le plus souvent transmises selon le mode autosomique récessif, plus rarement le mode dominant, et enfin, si le gène est porté par le chromosome X, comme un caractère récessif lié au sexe.

Afin de pouvoir interpréter les effets des anomalies moléculaires, il faut garder à l'esprit les faits suivants [1] :

toute protéine, enzymatique ou non, codée par un autosome, existe en deux exemplaires (allèles) hérités de chaque parent. Ce caractère diploïde contraste avec le système haploïde des bactéries. Quand la protéine anormale n'est produite que par l'un des allèles, l'hétérozygote est porteur de la maladie mais le plus souvent reste en bonne santé, car la protéine produite par l'allèle sain porte une activité suffisante. Ce n'est que dans de rares exemples que l'activité normale est voisine de la limite et que les hétérozygotes sont cliniquement atteints. Il faut y ajouter le cas où le produit muté est nocif et provoque des symptômes chez l'hétérozygote. La plupart des affections monogéniques ont donc un phénotype récessif sur le plan clinique. Sur le plan biologique, en revanche, les deux allèles sont codominants, chacun d'eux produit indépendamment la protéine pour laquelle il code. La production gouvernée par le chromosome altéré est déficiente, celle gouvernée par le chromosome normal reste inchangée. Il n'y a ni régulation ni compensation d'un chromosome par son partenaire. Les hétérozygotes, dans la plupart des cas, possèdent à peu près la moitié de l'activité des sujets normaux, et c'est la base du dosage génique, qui fut la première méthode utilisée pour la détection des hétérozygotes.

l'analyse ni compensation d'un chromosome par son partenaire. Les hétérozygotes, dans la plupart des cas, possèdent à peu près la moitié de l'activité des sujets normaux, et c'est la base du dosage génique, qui fut la première méthode utilisée pour la détection des hétérozygotes.

Les étapes de l'analyse

L'analyse comporte trois étapes, la protéine, l'ARN, l'ADN. Les deux premières s'attachent au phénotype, la dernière au génotype, qui est de mieux en mieux accessible après avoir pendant longtemps semblé hors d'atteinte.

La protéine. L'approche moléculaire d'une enzymopathie comporte plusieurs stades.

- Le dosage de l'activité reste la base du diagnostic, il montre sa diminution ou même son absence. S'il persiste une activité résiduelle, il convient de s'assurer qu'elle n'est pas due à la présence dans le tissu d'une isozyme mineure d'activité similaire mais codée par un autre gène que le

gène muté. Cette éventualité est fréquente dans les maladies lysosomiales, lorsque existent des hydrolases neutres, non lysosomiales, mais qui gardent une faible activité aux pH acides. C'est le cas, par exemple, dans la maladie de Fabry (déficit en α -galactosidase) et dans la maladie de Pompe (déficit en α -glucosidase). Si l'on y pense, des méthodes cinétiques et immunologiques doivent permettre assez aisément d'éliminer cette difficulté [2].

Si l'enzyme déficiente garde une activité résiduelle authentique, on en explorera les propriétés, cinétiques et physiques (stabilité à la chaleur, mobilité électrophorétique). Ces méthodes ont été bien codifiées, notamment par l'OMS (organisation mondiale de la santé) dans le cas des multiples variants de la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

- La dernière étape de l'analyse est la recherche de la protéine par les méthodes immunologiques. On a eu successivement recours à la consommation des anticorps, la précipitation en agar après diffusion

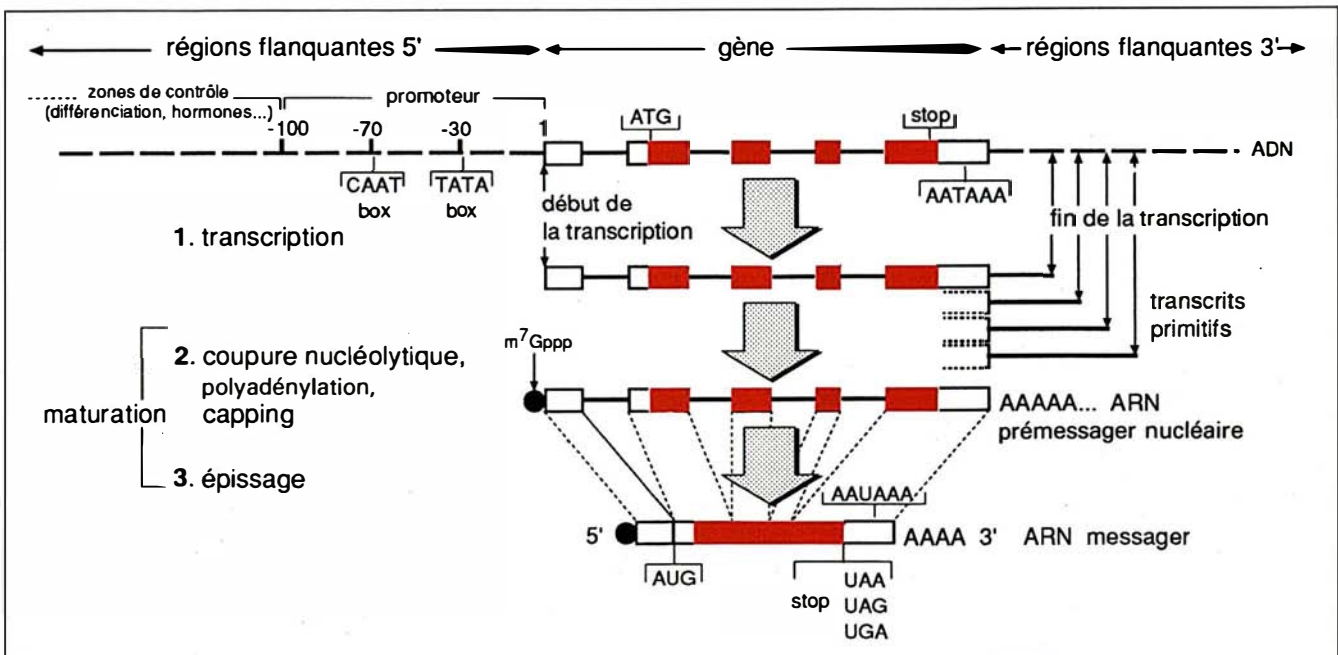


Figure 1. **Structure d'un gène eucaryotique codant pour une protéine.** Les exons sont représentés par des rectangles, blancs pour leur partie non codante et rouge pour leur partie codante. Les régions intergéniques correspondent aux lignes discontinues et les introns aux lignes continues. CAAT box et TATA box : éléments du promoteur. AATAAA (et AAUAAA au niveau de l'ARN) : signal de polyadénylation.

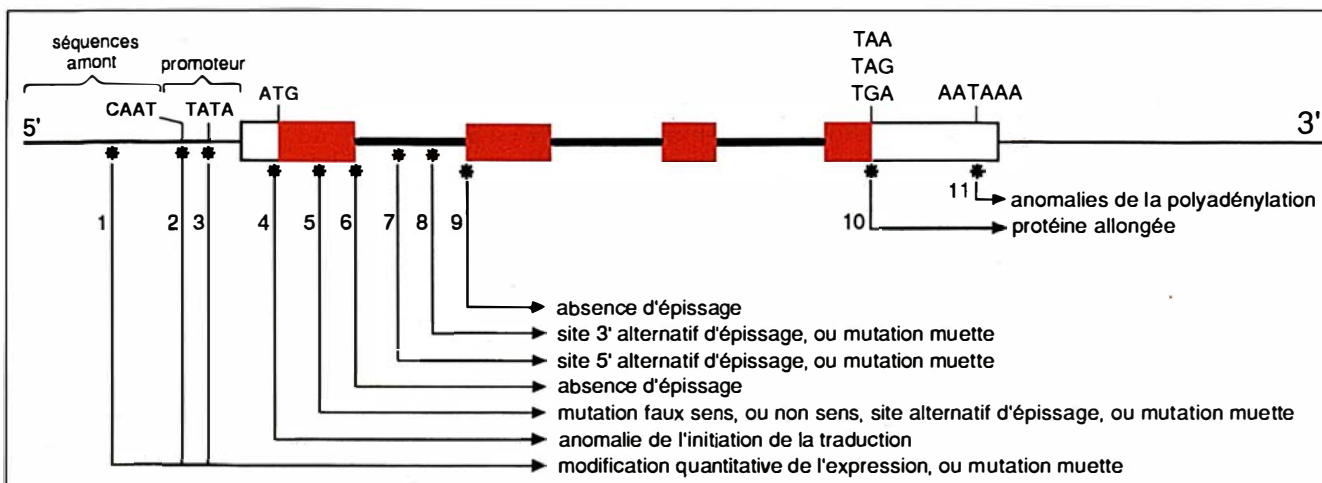


Figure 2. **Conséquences possibles des mutations ponctuelles d'un gène et de ses régions régulatrices.** Les traits fins représentent les régions intergéniques, les traits épais les introns, les rectangles blancs la partie non codante des exons et les rectangles rouges la partie codante des exons. Les « boîtes » CAAT et TATA du promoteur sont représentées, ainsi que le codon d'initiation de la traduction ATG, les codons stop TAA, TAG ou TGA, et le signal de polyadénylation AATAAA.

(méthode d'Ouchterlony), à l'immuno-électrophorèse, l'isolement sur des colonnes d'immuno-affinité, l'immunoprécipitation, enfin la détection après électrophorèse et transfert sur nitrocellulose (immunoblot, ou *western blot*). On peut ainsi conclure, soit qu'une molécule, inactive ou peu active mais immunologiquement reconnaissable, est présente (matériel à réaction croisée, CRM), soit, au contraire, qu'on a affaire à un allèle nul ou silencieux. Lorsqu'il persiste une activité enzymatique, le rapport de l'activité au nombre de molécules immunologiquement décelables permet de définir une « activité spécifique immunologique » : elle est abaissée si le site actif est atteint ; elle peut être normale s'il s'agit d'un défaut de synthèse, ou d'une instabilité menant à une dégradation accélérée.

L'ARN messager. La présence et l'activité de synthèse de l'ARN messager peuvent être recherchées dans les tissus qui, normalement, expriment l'enzyme. Pour en démontrer la présence, on en pratique l'hybridation avec une sonde correspondante d'ADN marqué. Cette hybridation peut être quantifiée par l'utilisation d'une gamme de taches contenant des quantités croissantes d'ARN pro-

venant du tissu étudié (*dot blot*) ; moins quantitative mais plus spécifique est l'hybridation après électrophorèse d'ARN (*northern blot*) qui permet de déceler d'éventuelles variations de taille du messager. On peut enfin pratiquer l'hybridation *in situ* sur des coupes cellulaires.

L'hybridation à l'ADN renseigne sur la présence du messager, mais ne permet pas de savoir s'il est ou non fonctionnel. Pour atteindre cet objectif, l'ARN doit être traduit en milieu acellulaire, par exemple dans le système de lysat de réticulocytes de lapin en présence d'acides aminés marqués ; un tel système contient tous les éléments nécessaires à la synthèse protéique. Le produit spécifique formé est ensuite identifié à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette méthode, laborieuse, et la seule possible il y a quelques années, est moins utilisée depuis la généralisation de la technique d'hybridation [3].

On peut donc mesurer la quantité et l'efficacité du messager dans sa traduction en protéine. Des méthodes plus délicates pourraient fournir des renseignements sur deux autres propriétés de l'ARN : sa vitesse de transcription à partir de l'ADN peut être mesurée sur des noyaux isolés, mais

il s'agit d'une technique lourde difficile à mettre en œuvre en pathologie ; la stabilité du messager peut être enfin prise en compte, un messager instable pouvant être responsable d'une biosynthèse insuffisante de protéine.

L'ADN. La composition d'un gène et ses méthodes d'analyse ont été décrites à maintes reprises dans *médecine/sciences* [4] (figure 1, p. 94). Le gène comporte des exons, des introns et des parties flanquantes qui ne seront pas transcrites. Le transcrit primaire d'ARN a la même longueur que la portion d'ADN dont il provient. Il subit ensuite des modifications (apport d'une coiffe, polyadénylation), puis une excision-épissage qui élimine les introns et le transforme en ARN messager, seul capable de traverser la membrane du noyau pour rejoindre les ribosomes. Il contient une partie codante, qui commence à un codon AUG (méthionine) pour se terminer à un des trois codons stop, et des parties non codantes en amont et en aval, et se termine par une queue de poly A annoncée par le signal de polyadénylation AAUAAA.

On conçoit aisément qu'une anomalie du gène, en quelque endroit qu'elle se fasse jour, provoque une

RÉFÉRENCES

3. Daegelen D, Munnich A, Levin MJ, *et al.* Absence of functional messenger RNA for glycogen phosphorylase in the muscle of two patients with McArdle's disease. *Ann Hum Genet* 1983 ; 47 : 107-15.
4. Kahn A. Structure des gènes chez les eucaryotes. *médecine/sciences* 1986 ; 2 (suppl. 7) : 2.
5. Bonifas JM. Cloning of a cDNA for steroid sulfatase : frequent occurrence of gene deletions in patients with recessive X chromosome linked ichthyosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 9248-51.
6. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondria DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988 ; 331 : 717-9.
7. Kazazian HH, Wong C, Youssoufian H, *et al.* Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 1988 ; 332 : 164-6.
8. Youssoufian H, Kazazian HH, Phillips DG, *et al.* Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 1986 ; 324 : 380-2.
9. Yang TP, Patel PI, Chinault AG, *et al.* Molecular evidence for new mutation at the hprt locus in Lesch-Nyhan patients. *Nature* 1984 ; 310 : 412-4.
10. Dreyfus JC. Mécanismes moléculaires de la vision des couleurs et du daltonisme. *médecine/sciences* 1987 ; 3 (suppl. 7) : 20-2.
11. Lehrman MA, Goldstein JL, Russell DW, Brown MS. Duplication of seven exons in LDL receptor gene caused by Alu-Alu recombination in a subject with familial hypercholesterolemia. *Cell* 1987 ; 48 : 827-35.
12. Harada F, Kimura A, Iwanaga T, *et al.* Gene conversion like events cause 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 8091-4.
13. Gounari F, Banks GR, Khazaie K, Jeggo PA, Holliday R. Gene reactivation : a tool for the isolation of mammalian DNA methylation mutants. *Genes Dev* 1987 ; 1 : 899-912.
14. Chottinger EG, Clott HJ, Tartaglia AP, Mitchell BS. Elevated adenosine deaminase activity and hereditary hemolytic anemia. Evidence for abnormal translational control of protein synthesis. *J Clin Invest* 1987 ; 79 : 1001-5.
15. Rabiet MJ, Elion J, Benarous R, Labie D, Josso F. Activation of prothrombin Barcelona. Evidence for active high molecular weight intermediates. *Biochim Biophys Acta* 1979 ; 584 : 66-75.
16. Noyes CM, Giffith MJ, Roberts HR, Lundblad RI. Identification of the molecular defect in factor IX Chapel Hill : substitution of histidine for arginine in position 145. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983 ; 80 : 4200-2.
17. Crine P, Des Parois L, Lecavalier H. Un code postal pour les enzymes lysosomiales. *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 453-60.
18. Poll-The BT, Vamecq J, Draye JP, Saubray JM. Enzymopathies peroxysomiales. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 553-9.

anomalie de la protéine que ce gène tient sous sa dépendance. Mais il existe un autre type de mécanisme d'altération d'une protéine, mécanisme dit post-traductionnel, c'est-à-dire qu'il survient après la biosynthèse de la chaîne polypeptidique elle-même. Beaucoup de protéines subissent en effet un processus de « maturation » complexe qui peut être perturbé à de nombreuses étapes. Les deux mécanismes ne sont d'ailleurs pas sans intrications, car c'est souvent parce que la protéine est elle-même altérée que sa maturation ne peut avoir lieu.

Les anomalies du gène

Elles peuvent se produire en tout point du gène. Il faut insister sur le fait que toutes les anomalies théoriquement concevables ont été observées, notamment dans les hémoglobinopathies, en particulier les thalassémies (figure 2, p. 95). Un nombre croissant en est décrit dans les enzymopathies. Deux grands groupes dominent la scène : les délétions (et accessoirement les insertions) et les mutations ponctuelles.

Délétions. Elles sont de taille variable ; une délétion complète supprime naturellement toute synthèse de la protéine correspondante. Une délétion partielle d'un ou plusieurs exons aboutit, soit à une absence de protéine, soit à la formation d'une protéine tronquée. Une délétion dans une zone régulatrice supprime ou diminue la synthèse, la protéine résiduelle restant alors normale. Dans un groupe de gènes comme celui des β -globines, certaines délétions d'un gène peuvent stimuler, par exemple, la synthèse de chaînes normalement réprimées chez l'adulte (chaînes γ). De petites délétions ou insertions (une ou deux bases) peuvent ne pas supprimer la synthèse ; cependant, si elles changent le cadre de lecture, elles provoquent la synthèse d'un produit aberrant. Il est possible actuellement d'évaluer la fréquence des délétions dans un certain nombre de maladies génétiques. Ce sont celles qui sont liées à l'X qui ont fait l'objet des études les plus poussées. Ces fréquences ont été évaluées à environ 10 % pour l'ornithine transcarbamylase et la maladie de Lesch-Nyhan. Elles sont par-

ticulièrement élevées dans le déficit en stéroïde sulfatase (cause de l'ichthyose congénitale), où elles atteignent 90 % des cas, et dans la myopathie de Duchenne (au moins 70 %) [5]. Des délétions ont été découvertes dans le génome des mitochondries et sont à la base de myopathies. Ces délétions, à transmission uniquement maternelle, ne s'observent que dans les muscles atteints et non dans les autres tissus [6]. Le mécanisme des délétions est le plus souvent un *crossing over* inégal par recombinaison entre des séquences homologues non alléliques, soit à l'intérieur d'un même gène (délétion partielle), soit à l'extérieur du gène (délétion complète).

Des délétions peuvent être rapprochées les insertions. Lorsqu'elles sont de petite taille, elles sont difficiles à repérer. Un cas intéressant est celui d'une insertion de grande taille ; le mieux étudié est celui d'une insertion d'environ 3 kb (kilobases) à l'intérieur de l'exon 14 du facteur VIII, apparue *de novo* car absente chez les parents [7].

Mutations ponctuelles. Le remplacement d'une base par une des trois autres change le codon correspondant. Ces changements peuvent entraîner des conséquences diverses. Quand un tel changement a lieu dans la partie codante d'un gène, le résultat est le remplacement d'un acide aminé par un autre, sauf si la base modifiée est la troisième d'un codon, ce qui le plus souvent ne change pas la nature de l'acide aminé codé (mutation neutre). Il s'ensuit la synthèse d'une protéine altérée, dont les propriétés s'échelonnent depuis celles d'une protéine instable ou inactive, jusqu'à celles d'un produit parfaitement fonctionnel et stable. A cette mutation « faux-sens », de loin la plus fréquente, il faut ajouter deux cas particuliers qui s'opposent : une mutation aboutissant à la formation d'un codon de terminaison interrompant prématurément la synthèse, laissant une protéine tronquée généralement inactive et non viable. A l'opposé, la mutation du codon normal de terminaison en un codon signifiant donne une protéine prolongée (jusqu'au codon stop suivant), en général instable. Les exemples de ce dernier type, encore peu nombreux, sont surtout connus dans

le domaine de l'hémoglobine.

Anomalies d'épissage. L'épissage peut être perturbé de plusieurs façons.

Une mutation peut créer un nouveau site d'épissage sur un exon de sorte qu'une partie de cet exon sera excisée ; des sites cryptiques d'épissage sont ainsi activés. A l'inverse, une mutation dans la zone de « consensus » au voisinage de la jonction exon-intron peut supprimer un site d'épissage, de sorte que l'intron ne sera pas éliminé. Cela entraîne soit une instabilité intranucléaire du précurseur ne pouvant subir une maturation normale, soit le passage dans le cytoplasme d'un ARN contenant un intron qui sera traduit avec des chances de rencontrer un codon de terminaison. Une même mutation à l'extrémité d'un exon pourrait ainsi provoquer un faux-sens, changer l'épissage, et se terminer en un non-sens. Un cas assez fréquent est qu'une mutation au site d'épissage n'empêche pas complètement le processus normal. On obtient un épissage alternatif, qui réduit la synthèse sans la supprimer. Il faut d'ailleurs noter que l'épissage alternatif existe également dans des conditions normales, et est de plus en plus souvent reconnu.

On peut remarquer enfin qu'une mutation de la troisième base d'un codon peut provoquer un défaut d'épissage alors que la séquence des acides aminés n'est pas modifiée. On en connaît un exemple dans une forme de β + thalassémie.

Des anomalies des séquences régulatrices peuvent provoquer des délétions ou des mutations dans les régions flanquantes 5' du gène, en particulier les boîtes TATA ou CAAT, qui peuvent déprimer ou même supprimer la biosynthèse. A l'autre extrémité, une mutation du signal de polyadénylation peut aboutir à l'accumulation de transcrits allongés et instables.

Des mutations peuvent en principe se créer en n'importe quel point du gène. Il existe cependant des points chauds (*hot spots*) où leur fréquence s'exacerbe. On connaît actuellement un mécanisme de formation de ces points chauds. Il provient des séquences de dinucléotides CpG, dans lesquels la cytosine est souvent méthylée. Les 5-méthylcytosines sont

instables et tendent à se désaminer, transformant ainsi C en T [8]. Il en résulte des mutations qui, assez souvent, donnent naissance à un codon stop, puisque T est la première base des trois codons stop. Les premiers exemples reconnus de ce mécanisme ont porté sur des cas d'hémophilie A. Il faut signaler que, si les mutations sont en général héréditaires, dans certaines maladies des mutations nouvelles viennent maintenir la fréquence d'une affection même grave. On admettait, sans preuve, que 30 % des maladies de Duchenne étaient dues à des néomutations. Ces hypothèses peuvent aujourd'hui être vérifiées — et souvent confirmées — par l'étude des polymorphismes de restriction et des délétions dans les familles. Le premier exemple d'une mutation nouvelle, c'est-à-dire non portée par un ascendant, a été fourni en 1984 dans la maladie de Lesch-Nyhan [9].

Les délétions-insertions et les mutations ponctuelles restent les plus fréquentes des anomalies génétiques. Deux autres mécanismes méritent d'être mentionnés.

- Le *crossing-over* inégal ou inéquationnel, déjà cité, peut, outre des délétions complètes ou partielles d'un gène unique, engendrer un changement du nombre des gènes d'une famille multigénique ou la formation de gènes hybrides, comme c'est le cas dans l'hémoglobine Lepore ou les gènes de la vision des couleurs [10]. Dans d'autres cas, le résultat de ces phénomènes est une duplication d'un fragment d'ADN. Un exemple remarquable est la duplication de sept exons dans le gène du récepteur de LDL (*low density lipoproteins*) par recombinaison entre des séquences Alu [11].

- La conversion génique, qui est le remplacement de tout ou partie de la séquence d'un gène par celle d'un gène apparenté, par échange de brins d'ADN entre deux locus similaires. Le meilleur exemple est celui du déficit en stéroïde 21-hydroxylase qui provoque l'hypertrémie des surrénales [12]. Il existe deux gènes : A est un pseudo-gène inactif ; B est le gène actif ; à côté de délétions du gène B, on trouve des cas où le gène B est partiellement converti en A et rendu ainsi inactif.

Enfin des anomalies de fonctionne-

ment d'un gène dont la séquence est normale pourraient être à l'origine de syndromes pathologiques. Par exemple, on sait que l'expression de certains gènes est liée au degré de méthylation de régions clés de ces gènes. Des changements, spontanés ou provoqués — notamment par l'azacytidine — conduiraient à une expression incorrecte des produits du gène, au moins dans certains tissus [13].

Le groupe des maladies directement liées à une anomalie du gène reste le plus important ; il comprend notamment l'ensemble des protéines solubles du cytoplasme, qui sont synthétisées sur les ribosomes sous leur forme définitive. Les principales conséquences possibles des lésions moléculaires sont : (1) la production d'une molécule normalement active mais instable ; (2) la production d'une molécule stable mais d'activité abaissée ; (3) la production en quantité insuffisante d'une protéine normale ; (4) la production de chaînes polypeptidiques paraissant normales, mais incapables de s'assembler pour former une structure quaternaire ; (5) dans de rares cas, une production excessive d'enzyme, le plus souvent en réaction secondaire à un blocage en un autre point de la même voie métabolique ; le seul cas authentifié d'élévation primitive est celui de l'adénosine désaminase des globules rouges (jusqu'à 100 fois dans quelques familles), et dont le mécanisme est encore incertain [14]. Un caractère fondamental à retenir est le haut degré d'hétérogénéité des protéines mutées et même normales. L'analyse au niveau de l'ADN a montré que le polymorphisme est encore plus marqué qu'on ne le pensait. Cette hétérogénéité entraîne une conséquence génétique importante : sauf quand les parents sont consanguins, un malade atteint d'une enzymopathie récessive a plus de chances d'être un hétérozygote composé, affecté de deux types différents de lésions moléculaires du même gène qu'un véritable homozygote.

Les anomalies post-traductionnelles

Un certain nombre de protéines ne sont pas « finies » lorsqu'elles quittent le ribosome ; c'est notamment le

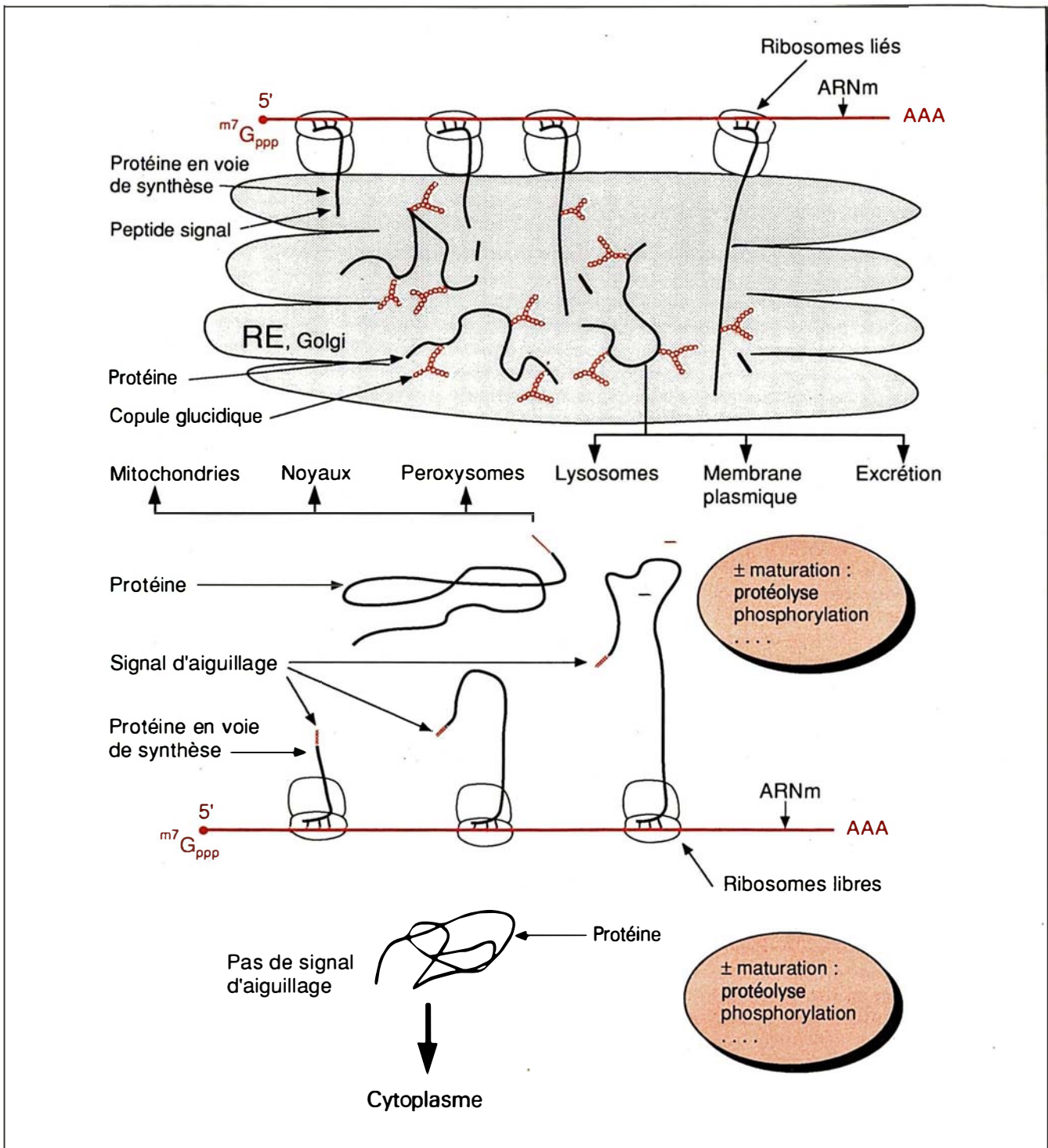


Figure 3. **Maturation post-traductionnelle et aiguillage d'une protéine.** L'ARNm peut être traduit par des ribosomes liés au réticulum endoplasmique (RE) ou libres. Dans le premier cas (protéines destinées à la membrane, à la sécrétion et aux lysosomes), le peptide N-terminal (peptide signal) est clivé dès son passage de la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines sont souvent glycosylées dans le corps du Golgi. Il faut noter qu'ici le passage de la membrane du réticulum endoplasmique est « co-traductionnel ». Dans le second cas (protéines destinées au noyau, aux mitochondries), la pénétration dans les organites est post-traductionnelle, probablement dirigée par un signal d'aiguillage dont plusieurs types sont connus pour les protéines mitochondriales et nucléaires. L'absence de signal équivaldrait à un aiguillage vers le cytoplasme.

cas de celles qui sont destinées à être transportées, soit à l'intérieur de la cellule vers les membranes ou les organites subcellulaires, soit à l'extérieur, par exemple dans le plasma (figure 3). Ces protéines portent souvent un « peptide signal », destiné à être éliminé au passage de la membrane, et d'autres signaux assurant un aiguillage correct vers leur destination. Elles peuvent accepter des ligands, lipidiques et glucidiques ; la glycosylation, en particulier, est un processus complexe qui s'effectue dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elles sont souvent des « pro-protéines » destinées à être scindées par protéolyse pour donner les enzymes matures actives, soit en route soit à destination. Les exemples classiques en sont les zymogènes des protéases digestives, qui ne seront activés que dans le tube digestif. Les processus de maturation des enzymes multiples des lysosomes et des mitochondries sont aujourd'hui bien connus. Les mécanismes par lesquels un déficit peut être engendré sont variés.

- Non-maturation protéolytique par suite d'une mutation : c'est le cas d'une prothrombine qui ne peut être transformée en thrombine par suite de la disparition du site normal de coupure [15] ; c'est aussi celui d'une forme d'hémophilie par déficit en facteur IX [16]. Cette situation indique clairement l'intrication des mécanismes géniques et post-traductionnels, puisque c'est l'altération du gène qui empêche la maturation.

- Absence d'un signal nécessaire à la reconnaissance de la protéine par l'organite qui doit la prendre en charge. L'exemple typique est celui des enzymes des lysosomes, dont le signal de reconnaissance est un groupement mannose-6-phosphate [17] placé sur la copule glucidique par un système à deux enzymes (Tableau I) ; le défaut de ce système dans les mucopolidoses II et III entraîne l'impossibilité pour l'ensemble des enzymes qui ont perdu leur clé de pénétrer dans le lysosome. D'où l'absence quasi complète des enzymes lysosomiales dans la cellule et, au contraire, un reflux extraordinaire dans le plasma, 10 à 100 fois supérieur au taux normal, qui en permet aisément le diagnostic.

- Absence complète d'un organite,

m/s n° 2 vol. 5, février 89

Tableau I

FORMATION EN DEUX TEMPS DU MARQUEUR
DE RECONNAISSANCE MANNOSE-6-PHOSPHATE
SUR LES ENZYMES DU LYSOSOME

Première étape. Transfert de N-acétyl- α -glucosamine-1-phosphate sur un accepteur de l'enzyme contenant du mannose \rightarrow formation d'un diester N-acétyl- α -glucosamine-1-phosphate-6-mannose. Cette étape est défectueuse chez les malades souffrant de mucopolidoses II et III.

Deuxième étape. Hydrolyse du radical N-acétyl- α -glucosamine, exposant le groupe mannose-6-phosphate.

ou son imperméabilité à l'entrée de ses constituants normaux : c'est le cas de maladies des peroxysomes, et notamment du syndrome de Zellweger [18].

- Difficultés dans le cheminement d'une protéine qui s'embourbe en route et ne peut parvenir à destination. Un exemple en est le déficit en sucrase-isomaltase, dû probablement à l'absence d'une étape de la glycosylation [19].

Mécanismes indirects de déficits

Il peut arriver qu'une enzyme, normalement synthétisée, ne fonctionne cependant pas. Une cause, connue depuis longtemps, est le déficit en une vitamine, indispensable en tant que précurseur de coenzyme. On ne saurait trop insister sur l'importance médicale de ces carences, puisque c'est un des rares exemples où un traitement se montre efficace dans des déficits enzymatiques. Des travaux plus récents ont mis en évidence d'autres mécanismes.

Défaut d'activation. On peut en décrire deux types. Le premier relève d'une erreur d'interprétation : beaucoup de protéines existent sous deux formes, active et inactive, sous l'influence de systèmes régulateurs. Parmi ceux-ci, la phosphorylation occupe une position de premier plan. Un exemple typique en pathologie est celui du système phosphorylase/phosphorylase-kinase. Un déficit en phosphorylase hépatique a été décrit jusqu'à ce qu'il soit démontré que la phosphorylase du glyco-gène n'est active que lorsqu'elle est

phosphorylée par sa kinase, qui est le véritable siège du déficit [20]. Un autre exemple frappant est celui de la cascade de la coagulation, dans laquelle une lésion à n'importe quel stade entraîne un défaut d'activation de toutes les enzymes en aval.

Absence d'un activateur spécifique. Beaucoup d'enzymes des lysosomes ont comme substrat un lipide et ne peuvent agir directement sur lui. La réaction exige la présence d'une protéine capable de former avec le substrat un « complexe lipide-activateur » qui apparaît comme le véritable substrat de la réaction. Des sujets possédant une enzyme normale mais pas d'activateur ont un déficit clinique dont l'origine est restée longtemps mystérieuse. L'exemple le mieux étudié est celui d'un variant de la maladie de Tay-Sachs, qui est due au déficit en l'activité de la β -hexosaminidase. Dans ce variant, les deux isozymes A et B de l'hexosaminidase sont présentes mais ne sont pas fonctionnelles, et le déficit est dû à l'absence de l'activateur spécifique [21].

Absence d'un stabilisateur. Certaines maladies présentent un déficit en plusieurs enzymes, non reliées entre elles génétiquement. Deux exemples en sont connus.

(1) Le déficit multiple en sulfatases comporte une baisse d'activité de toutes les sulfatases connues. Il semble dû au défaut d'une protéine qui les stabilise, mais celle-ci n'a pas encore été isolée.

(2) On est plus avancé en ce qui concerne une autre affection lysosomiale appelée galactosialidose. Elle comporte un déficit en deux

RÉFÉRENCES

19. Lloyd ML, Olsen WA. A study of the molecular pathology of sucrase isomaltase deficiency. A defect in the intracellular processing of the enzyme. *N Engl J Med* 1987; 316: 438-42.
20. Huijing F. Phosphorylase kinase in leukocytes of normal subjects and of patients with glycogen storage disease. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 601-3.
21. Conzelmann E, Sandhoff K. AB variant of infantile GM2 gangliosidosis: deficiency of a factor necessary for stimulation of hexaminidase A catalyzed degradation of ganglioside GM2 and glycolipid GA2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 3979-83.
22. Galjart NJ, Gillemans N, Harris A, et al. Expression of cDNA encoding the human « protective protein » associated with lysosomal β galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* 1988; 54: 755-64.
23. Bach G, Friedman R, Weissmann B, Neufeld E. The defect in the Hurler and Scheie syndromes: deficiency of α -L iduronidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 2048-9.
24. Leroux A, Junien C, Kaplan JC, Bamberger J. Generalized deficiency of cytochrome b5 reductase in congenital methaemoglobinemia with mental retardation. *Nature* 1975; 258: 619-20.
25. Dreyfus JC, Poenaru L, Svennerholm L. Absence of hexosaminidase A and B in a normal adult. *N Engl J Med* 1975; 292: 61-3.
26. Kaback MM, Zeiger RS. Heterozygote detection in Tay-Sachs disease: a prototype community program for the prevention of genetic diseases. In: Volk BW, Aronson SM, eds. *Sphingolipidoses and Allied Disorders*. New York: Plenum Press, 1972: 613-32.
27. Romeo G. Enzymatic defects of hereditary porphyrias: an explanation of dominance at the molecular level. *Hum Genet* 1977; 39: 261-76.
28. Grandchamp B, Phung N, Nordmann Y. Homozygous coproporphyrinuria. *Lancet* 1977; ii: 1348-9.
29. Wexler NS, Young AB, Tanzi R et al. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 1987; 326: 194-7.
30. Dreyfus JC. Les maladies récessives liées au chromosome X dans le sexe féminin. *médecine/sciences* 1987; 3: 108.
31. Scott CF, Carrell RW, Glaser CH, et al. α_1 antitrypsin Pittsburg. A potent inhibitor of human plasma factor XI a, Kallikrein and factor XIII f. *J Clin Invest* 1986; 77: 631-4.
32. Kahn A. L'amplification *in vitro* des fragments d'ADN par PCR (*polymerase chain reaction*): un tournant en génétique. *médecine/sciences* 1988; 4: 515-8.
33. Lyonnet S, Rey F, Caillaud C, Abadie V, Munnich A, Rey J. Bases moléculaires de la phénylcétonurie en France: de l'invasion celtique à la bataille de Poitiers. *médecine/sciences* 1988; 4: 544-52.
34. Labie D. Origine multicentrique de la mutation S. *médecine/sciences* 1987; 3: 54-5.

enzymes, la β -galactosidase et la neuraminidase. Les gènes de structure sont normaux, mais on a montré l'absence d'une glycoprotéine — dont le gène a été récemment cloné — qui se lie à la galactosidase; cette liaison est indispensable à la polymérisation de l'enzyme, seule forme sous laquelle elle est stable. L'addition de la glycoprotéine à une culture de fibroblastes déficients restaure l'activité des deux enzymes [22].

Isoformes, allèles et polymorphisme clinique

Des déficits portant sur une même activité peuvent se traduire par des symptômes très différents, tant cliniques que biologiques. A cet égard on peut distinguer deux types.

- **Les isozymes vraies.** Les enzymes peuvent être ubiquitaires ou spécifiques d'un ou de quelques tissus. Même parmi celles qui font partie d'une voie métabolique générale comme la glycolyse, certaines sont génétiquement différentes selon les tissus. Cela explique pourquoi leur déficit atteint électivement certains organes en épargnant d'autres. Sauf exception, un déficit n'est pas compensé par une élévation d'un autre type d'isozyme (Tableau II).

- **Relations entre l'anomalie moléculaire et la symptomatologie.** Assez souvent, on est frappé par un manque d'adéquation entre symptômes

biochimiques et cliniques. Ce phénomène peut jouer dans les deux sens: certaines maladies métaboliques reconnaissent plusieurs lésions biochimiques. L'exemple le plus frappant est celui de la mucopolysaccharidose de type III (syndrome de Sanfilippo). Un tableau clinique identique (retard mental, anomalies du squelette) dû à une dégradation insuffisante de l'héparane sulfate, peut relever de quatre déficits enzymatiques distincts qui peuvent interrompre cette voie (Tableau III).

Mais beaucoup plus fréquent est le phénomène inverse: un même déficit enzymatique provoque des symptômes qui varient en intensité et même en nature. Cette variabilité peut certes se comprendre à partir d'une éventuelle activité résiduelle et de ses propriétés. Pour de nombreuses affections, une perte complète d'activité correspond à des formes sévères du nourrisson, une diminution sans disparition à des formes plus tardives. Une autre explication logique dérive du mécanisme du déficit: des enzymes instables donneront surtout des troubles dans les cellules dépourvues de synthèse protéique, au premier chef les globules rouges, l'exemple de choix étant fourni par le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Certains cas, en revanche, résistent à toute interprétation rationnelle: la plus sévère des mucopolysaccharidoses, le type I (Hurler) et la plus

Tableau II
DÉFICIT EN ISOZYMES SPÉCIFIQUES DE TISSUS

Enzymes	Tissus
Glycogène phosphorylase, type muscle	Muscle
Glycogène phosphorylase, type foie	Foie
Phosphorylase kinase, type foie	Foie, globules rouges
Phosphofruktokinase, type muscle	Muscle, globules rouges
Phosphofruktokinase, type foie	Foie, globules rouges
Aldolase B, type foie	Foie
Pyruvate kinase, type foie	Globules rouges
Lactate déshydrogénase, type muscle	Muscle
Lactate déshydrogénase, type cœur	Globules rouges
Myoadénylate désaminase, type muscle	Muscle
Fructose diphosphatase, type foie	Foie

Tableau III	
DÉFICITS ENZYMATIQUES DU SYNDROME DE SANFILIPPO	
Type A	2-désoxyglucoside-2-sulfamate sulfatase
Type B	α -N-acétylglucosaminidase
Type C	acétyl CoA : α -glucosaminide-N-acétyltransférase
Type D	N-acétylglucosamine-6-sulfate sulfatase

bénigne, le type Is (Scheie) sont toutes deux dues à un déficit en α L-iduronidase, et la démonstration d'une activité dans le type Is n'est pas convaincante [23]. Il faudra attendre l'analyse des séquences pour comprendre les différences entre ces deux syndromes probablement alléliques. Mentionnons encore le déficit en méthémoglobine réductase (diaphorase) ou cytochrome b5 réductase. Il existe sous deux formes génétiques, une bénigne, simple « tatouage » cyanotique, limitée aux globules rouges, et une très grave, avec retard psychomoteur et mort en bas âge, dans laquelle le déficit atteint tous les tissus. La base moléculaire de cette différence n'est pas encore élucidée [24].

Pseudo-déficits. De ce qui précède, on peut déduire qu'une certaine activité résiduelle peut retarder l'apparition de symptômes jusqu'à l'âge adulte et rendre difficile leur attribution à une maladie génétique. On a même décrit des familles, étudiées systématiquement parce qu'à risque pour des affections graves, dans lesquelles des individus biologiquement déficients sont cliniquement bien portants. Ces déficits purement biologiques ont été décrits pour les hexosaminidases et les arylsulfatases [25]. De telles observations, lorsqu'elles sont faites dans une famille à risque, compliquent singulièrement le problème du diagnostic prénatal.

Hétérozygotie

Les hétérozygotes pour un déficit enzymatique possèdent en principe une activité voisine de 50 % de la normale. Leur reconnaissance est plus facile lorsqu'on dispose d'une référence interne : le rapport hexosaminidase A/hexosaminidase totale a

permis la détection systématique des porteurs de la maladie de Tay-Sachs et la mise sur pied d'un vaste programme de prévention dans les populations à risque [26].

La reconnaissance des hétérozygotes est beaucoup plus difficile pour les enzymes spécifiques d'un tissu tel que foie ou muscle, faute d'un nombre suffisant de témoins permettant de définir les limites normales.

• Dans les maladies dominantes, on ne trouve en général pas d'anomalie enzymatique définie. Il existe cependant un groupe d'affections qui fait exception (Tableau IV). Dans les porphyries, en effet, l'hérédité est domi-

nante, à part la porphyrie érythropoïétique (maladie de Gunther) qui est récessive. Des dosages précis ont montré que les malades ont une activité inférieure environ de moitié à celle des témoins. En outre, les études familiales ont montré que de nombreux membres asymptomatiques de la famille ont les mêmes valeurs que les malades [27]. On sait que les manifestations cliniques sont déclenchées par certains médicaments qui, activant la synthèse d'une hémoprotéine, le cytochrome P450, augmentent les besoins en hème. Il semble qu'une activité équivalente à 50 % de la normale ne suffise pas, mais chez certains sujets seulement, à faire face à ces exigences. On trouve dans ces maladies un autre mystère : alors que, habituellement, une affection dominante est gravissime ou même non viable à l'état homozygote, on connaît des malades homozygotes pour des déficits en enzymes de la biosynthèse de l'hème ; ils devraient avoir un blocage complet de cette voie ; pourtant leur maladie est relativement bénigne et ils ne sont même pas anémiques [28]. On connaît un autre exemple, celui de la maladie de Huntington [29] où les homozygotes, dans une affection

Tableau IV		
LES DIFFÉRENTS TYPES DE PORPHYRIE		
Classification	Enzyme déficiente	Transmission
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Erythropoïétique</i> - Porphyrie érythropoïétique congénitale - Protoporphyrine érythropoïétique 	<ul style="list-style-type: none"> Uroporphyrinogène III cosynthase Ferrochélatase 	<ul style="list-style-type: none"> Autosomique récessif Autosomique dominant
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Hépatique</i> - Porphyrie aiguë intermittente - Coproporphyrine héréditaire - Porphyrie <i>variegata</i> - Porphyrie cutanée tardive 	<ul style="list-style-type: none"> Porphobilinogène désaminase Coproporphyrinogène oxydase Protoporphyrinogène oxydase ou ferrochélatase Uroporphyrinogène décarboxylase 	<ul style="list-style-type: none"> Autosomique dominant Autosomique dominant Autosomique dominant Autosomique dominant

pourtant sévère, ne sont pas cliniquement plus atteints que les hétérozygotes.

• Dans les maladies récessives liées au sexe, les filles hétérozygotes ne montrent en général aucune anomalie clinique. De rares exceptions existent cependant. On a d'abord attribué ces atteintes à la « lyonisation », cas extrême où la presque totalité des chromosomes X fonctionnels proviendrait du parent porteur de la tare. Il semble actuellement que le mécanisme le plus fréquent soit une translocation partielle d'un des X sur un autosome. Dans ces conditions, la règle est que seul le chromosome transloqué soit actif. Si la cassure passe au milieu d'un gène, celui-ci est détruit ; son allèle normal reste inactif. Ce mécanisme a notamment été reconnu à l'origine de myopathies, d'hémophilie et de maladie de Hunter chez des filles [30].

Conclusion

Les lésions moléculaires des enzymopathies, et plus généralement des maladies héréditaires monogéniques, se produisent à toutes les étapes de la biosynthèse, et leur connaissance progresse très rapidement. Des résultats importants pour la compréhension des mécanismes du fonctionnement des enzymes ou de leurs inhibiteurs ont déjà été obtenus. Le plus impressionnant a été fourni par un malade chez lequel une mutation ponctuelle (méthionine → arginine) avait suffi pour conférer à son anti-trypsinase les propriétés d'une anti-thrombine, entraînant des conséquences catastrophiques [31]. On est toutefois encore loin de reconnaître la manière dont le génotype (lésion de l'ADN) façonne le phénotype (lésion de la protéine et ses conséquences cliniques). On peut cependant espérer y parvenir dans un avenir proche : le principal obstacle à l'élucidation des lésions moléculaires dans les affections génétiques était la nécessité de cloner le gène étudié et par conséquent de construire une banque d'ADN pour chaque malade, suivie d'une analyse longue et fastidieuse pour essayer de cerner la mutation. La situation a changé de tout au tout avec le développement de la technique de PCR (*polymerase*

chain réaction) [32]. On peut désormais amplifier les régions du gène que l'on suspecte, éliminant la nécessité du clonage, et obtenir les fragments en quantité telle qu'il est aisé de les séquencer. Il est même possible d'entreprendre un travail systématique à partir des taches de sang prélevées à la naissance pour le test de Guthrie, et l'équipe qui propose cette technique a déjà obtenu des résultats remarquables sur la répartition des différentes anomalies du gène de la phénylalanine hydroxylase dans la phénylcétonurie [33]. Toutefois, des premiers résultats de cette technique, confrontés aux données antérieures, il ressort qu'il convient d'être encore très prudent dans les interprétations : une même mutation peut apparaître indépendamment dans des ethnies différentes, et il serait souvent risqué d'en déduire des conclusions sur les migrations de populations ; la démonstration formelle en a été apportée pour la drépanocytose [34] et plusieurs enzymopathies sont en cours d'exploration dans ce sens. De tels résultats peuvent s'interpréter à la lumière de l'hypothèse des points chauds de mutation que nous avons évoquée plus haut. Une autre technique très prometteuse pour l'étude des maladies génétiques est celle des animaux transgéniques, qui permet de créer, et de guérir, une maladie déterminée chez l'animal.

Naturellement, les résultats obtenus par injection d'ADN dans l'embryon de souris ne sont pas transposables à l'espèce humaine, dans laquelle la transplantation de gène dans la lignée germinale ne se fera probablement jamais. Néanmoins, la greffe à un sujet malade de ses propres cellules somatiques prélevées, transfectées avec le gène codant pour l'activité déficiente, puis greffées (thérapeutique génique « somatique ») pose moins de problèmes éthiques et théoriques et devrait être, à terme, proposée à certains malades. Ces cellules somatiques génétiquement recombinées pourraient être des cellules médullaires, des cellules de la peau (fibroblastes ou kératinocytes), voire des hépatocytes. La perspective, récemment dégagée, d'insérer « un gène à sa place » rapproché peut-être le temps de ces premiers traitements génétiques ■

Summary

Molecular mechanisms of genetic enzymopathies

This review aims at covering the complex field of monogenic genetic diseases with special emphasis on enzymopathies. It first considers the steps of genetic analysis, at the level of protein, RNA and DNA. Recent advances are stressed ; examples of various kinds of deletions and point mutations are given such as crossing over, gene conversion, deletions of mitochondrial DNA, splice mutations, hot-spot mutations. The second part is devoted to posttranslational abnormalities. It includes problems of the maturation of protein : glycosylation, binding of specific signals necessary for correct dispatching, and proteolytic processing. Abnormal behaviour of normal enzymes may be due to a lack of activation (*e.g.* phosphorylation), of an activator or a stabilizer. An important point is heterogeneity, whether due to the existence of isozymes or to allelic mutations. The final problem to be discussed is that of heterozygotes, especially in dominant diseases with the example of porphyrias, and in sex-linked recessive forms, with a discussion of genetic diseases in heterozygous females. In conclusion one may insist on the rapid pace of advances in the understanding of molecular mechanisms, due to new techniques like PCR and transgenes ; this raises hopes for the possibility of gene therapy at the somatic level in a not too remote future.

TIRÉS A PART

J.-C. Dreyfus.