

## Maladies génétiques

# DOUBLECORTINE, un nouveau gène exprimé dans le cerveau foetal, est impliqué dans les hétérotopies laminaires sous-corticales et les lissencéphalies liées au chromosome X

La génétique de l'épilepsie et des malformations cérébrales de l'enfant représente un enjeu majeur du fait de la fréquence et de la gravité de ces affections. Parmi les malformations cérébrales responsables d'épilepsies sévères, parfois intractables, les hétérotopies laminaires sous-corticales (HLSC), appelées aussi hétérotopies en bande ou double cortex, constituent une entité anatomo-clinique homogène caractérisée par une « bande » de cortex (donc de cellules neuronales) hétérotopique située dans la substance blanche sous le cortex, la gyration étant, par ailleurs, habituellement normale. Les hétérotopies laminaires sous-corticales sont habituellement révélées par une épilepsie et un retard mental de gravité variable (*m/s n° 6-7, vol. 13, p. 911*). Les bandes bilatérales d'hétérotopies sous-corticales (*figure 1A*) sont en général bien visibles en imagerie par résonance magnétique (IRM). Les lissencéphalies – autres dysgénésies corticales – forment un groupe plus hétérogène, associant un retard mental sévère, une épilepsie rebelle et une agyrie ou pachygyrie diffuse, c'est-à-dire un cortex anormalement épais avec très peu de circonvolutions (*figure 1B*). Ayant observé des familles dans lesquelles les filles étaient atteintes d'HLSC et les garçons atteints de lissencéphalie, des neuropédiatres de Paris (hôpital Saint-Vincent-de-Paul) et de Reims ont décrit un nouveau syndrome, X-SCLH/LIS, associant ces deux types

de malformations corticales [1]. La transmission exclusive par les femmes et la gravité des formes affectant les garçons, ont fortement suggéré une transmission dominante liée au sexe.

Nous avons réalisé une étude de liaisons génétiques sur 3 familles présentant des filles avec HLSC et des garçons avec lissencéphalie, dont l'ADN avait été recueilli grâce aux services du Généthon. L'analyse combinée des 3 familles, réalisée avec 38 marqueurs polymorphes, a permis d'exclure tout lien avec les hétérotopies nodulaires périvertri-

culaires bilatérales localisées en Xq28 [2] et a montré une liaison en Xq22.3 (*lod score*=2,1, *q*=0) dans une région critique de 9,2 cM [3]. Ce locus correspond par ailleurs à la localisation d'une translocation 46,XX,t (X;2) (q22;p25) décrite chez une fille ayant une lissencéphalie [4]. La combinaison des données cytogénétiques et des analyses de liaison permit de réduire la région candidate à 3 mégabases. Nous avons établi un *contig* de 26 YAC (*yeast artificial chromosomes*) couvrant la région critique puis nous avons localisé sur ce *contig* des EST (*expres-*

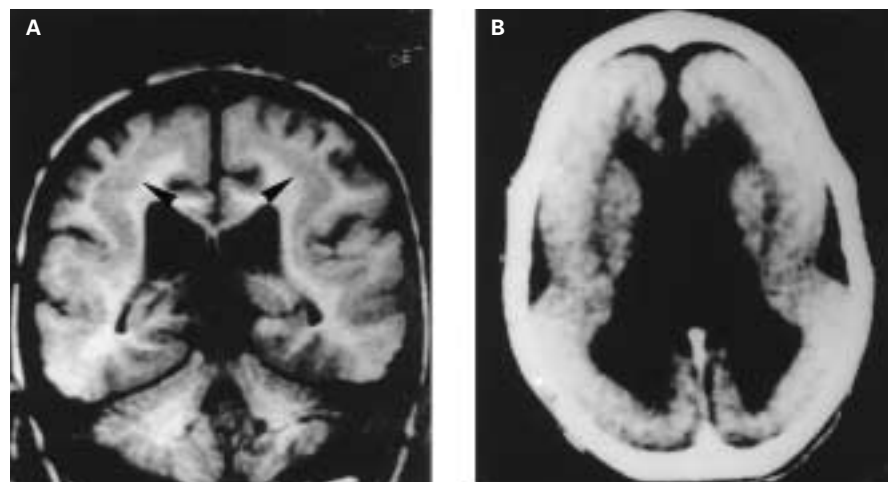


Figure 1. **Imagerie par résonance magnétique du cortex.** **A.** Hétérotopie laminaire sous-corticale : une bande de cortex (substance grise) est située sous le cortex dans la substance blanche donnant une image de double-cortex. **B.** Lissencéphalie : le cortex est anormalement épais et présente peu de circonvolutions.

*sed sequence tags*), c'est-à-dire des séquences exprimées issues de banques d'ADN complémentaire qui avaient été préalablement localisées de manière grossière dans la région Xq22-q24 sur des hybrides d'irradiation. Le profil d'expression de huit EST localisés sur le *contig* de YAC a été étudié par hybridation sur *Northern blots* de différents tissus humains, adultes et fœtaux. Cette analyse a montré qu'un des EST hybridait avec un ARNm très abondant de 9,5 kb, exprimé exclusivement dans le cerveau fœtal. Nous avons donc criblé une banque de phages d'ADNc issue de cerveau fœtal pour isoler la totalité du transcrit. Ce gène étant très fortement exprimé, nous avons obtenu au total plus de 50 clones, au cours de 7 marches successives. A chaque étape, chaque extrémité de chaque clone a été séquencée, ce qui a permis, grâce à la redondance des clones, d'obtenir une séquence consensus de 9,5 kb, sans sous-clonage ultérieur [5].

Ce transcrit comporte une très longue partie 3' non codante de 8 kb. Un seul cadre ouvert de lecture possible, de 1 080 paires de bases, a été retrouvé et code pour une protéine de 40 kDa, composée de 360 acides aminés. Nous avons appelé cette protéine Doublecortine, en raison de l'aspect IRM en « double-cortex » formé par les bandes de substance grise hétérotopique. L'étude de la séquence en acides aminés de la protéine prédite retrouve de nombreux sites potentiels de phosphorylation (par la protéine-kinase C ou la caséine-kinase 2). Le profil d'hydrophobicité ne retrouve pas de région hydrophobe évoquant un domaine transmembranaire ou un peptide signal. Cette protéine semble donc à première vue intracellulaire, non sécrétée. Les recherches d'analogie avec des séquences nucléiques ou protéiques connues (*swissprot*) retrouvent une identité de 75 % avec l'extrémité amino-terminale d'une protéine, synthétisée elle aussi dans le cerveau fœtal (KIAA0369). La partie carboxy-terminale de cette protéine présente une analogie très significative avec une kinase dépendante du

calcium et de la calmoduline, type II, identifiée chez le rat (Cpg16).

Pour valider ce gène candidat, nous avons recherché des mutations chez les garçons atteints de lissencéphalie et des filles atteintes de HLSC [5]. N'ayant pas d'emblée déterminé la structure génomique et les jonctions intron/exon de ce gène, nous avons étudié l'ADN complémentaire de lignées lymphoblastoïdes des sujets atteints par transcription inverse et amplification PCR de transcrits illégitimes [6]. La séquence codante a été divisée en 4 fragments chevauchants. Une mutation ponctuelle faux-sens a été retrouvée dans chacune des trois familles ayant participé à l'étude de liaisons génétiques. La co-ségrégation de ces mutations ponctuelles avec la maladie a été confirmée par digestion avec diverses enzymes de restriction dont les sites ont été créés ou détruits par les mutations. Par ailleurs, chez une fille atteinte de pachygyrie avec hétérotopies et agénésie calleuse, nous avons amplifié un fragment de plus petite taille, qui s'est avéré être un transcrit délété de tout un exon par mutation ponctuelle sur un site d'épissage confirmé sur ADN génomique. L'absence de cet exon de 103 pb décale le cadre de lecture et provoque l'apparition d'un codon stop très précoce et la synthèse d'une protéine tronquée. Ces quatre mutations confirment l'implication du gène *DOUBLECORTINE* dans les lissencéphalies et les hétérotopies laminaires sous-corticales. Par la suite, après avoir cloné la totalité des 9 exons du gène *DOUBLECORTINE* et déterminé les jonctions intron/exon, des mutations ont été recherchées par DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) [7] sur quinze autres cas d'HSLC. Dans deux tiers des cas, des mutations nulles ou faux-sens ont été retrouvées, confirmant ainsi le rôle majeur de *DOUBLECORTINE* dans cette maladie.

En parallèle, une étude de l'expression du gène *DOUBLECORTINE* dans le cerveau fœtal a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de biochimie cellulaire du Collège de France (Pr Yoheved Netter) et le laboratoire d'histo-embryologie de la Salpêtrière (Dr M. Catala). L'hybridation *in situ* de ribosondes *DOU-*

*BLECORTINE* sur coupes de cerveau fœtal humain (21 semaines d'âge gestationnel) a montré une forte expression dans la zone ventriculaire et la plaque corticale. Dans la zone intermédiaire, les cellules marquées sont organisées en chaînettes, évoquant des neurones en migration. En outre, l'amplification par RT-PCR du transcrit *DOUBLECORTINE* sur différentes cultures primaires de cellules neuronales et gliales murines, a montré une forte expression dans les cellules neuronales en culture et le cerveau d'embryon de E15 à J1 postnatal, contrastant avec l'absence de son expression dans les cellules gliales [5]. Ces résultats sont en accord avec l'implication du gène *DOUBLECORTINE* dans des affections de la migration neuronale.

Parallèlement à nos travaux, et indépendamment, l'équipe américaine qui avait décrit la translocation X;2 (q22;p25) a abouti à l'identification du même gène que nous [8].

L'identification du gène *DOUBLECORTINE*, responsable des hétérotopies laminaires sous-corticales et des lissencéphalies liées à l'X, ouvre de nombreuses perspectives, médicales et neurobiologiques. Tout d'abord, avec le gène *LIS1* [9] impliqué dans le syndrome de Miller-Dieker et certaines lissencéphalies isolées (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1124*), une nosologie moléculaire des malformations cérébrales de l'enfant, en particulier des dysgénésies corticales, se met progressivement en place. Deuxièmement, la mise à disposition des familles d'un diagnostic moléculaire des HLSC et des lissencéphalies, sera très utile au conseil génétique et au diagnostic anténatal éventuel de cette encéphalopathie épileptogène très sévère. Enfin, la compréhension progressive des mécanismes moléculaires impliqués dans la migration neuronale et la lamination corticale en six couches permet d'espérer la mise au point de thérapies innovantes, en particulier dans le champ de l'épilepsie ■

Vincent des Portes  
Jean-Marc Pinard  
Fiona Francis  
Jamel Chelly

*m/s n° 2, vol. 14, février 98*

1. Pinard JM, Motte J, Chiron C, Brian R, Andermann E, Dulac O. Subcortical laminar heterotopia and lissencephaly in two families: a single X linked dominant gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994; 57: 914-20.
2. Eksioglu Y, Scheffer I, Cardenas P, Knoll J, DiMario F, Ramsby G, Berg M, Kamuro K, Berkovic S, Duyk G, Parisi J, Huttenlocher P, Walsh C. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron* 1996; 16: 77-87.
3. Des Portes V, Pinard JM, Smadja D, Motte J, Boespflug-Tanguy O, Moutard ML, Desguerre I, Billuart P, Carrié A, Bienvenu T, Vinet MC, Bachner L, Beldjord C, Dulac O, Kahn A, Ponsot G, Chelly J. Dominant X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome (X-SCLH/LIS): evidence for the occurrence of mutation in male and mapping of a potential locus in Xq22. *J Med Genet* 1997; 34: 177-83.
4. Ross E, Allen K, Srivastava A, Featherstone T, Gleeson J, et al. Linkage and physical mapping of X-linked lissencephaly/SBH (XLIS): a gene causing neuronal migration defects in human brain. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 555-62.
5. Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Identification of a novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 1998; 92: 51-61.
6. Briand P. Transcription illégitime: implications et mécanismes possibles. *Med Sci* 1990; 6: 55-6.
7. Dreyfus JC, Akli S, Poenaru L. Maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Les déficits en  $\beta$ -hexosaminidases, modèles des maladies des lysosomes. *Med Sci* 1992; 8: 797-803.
8. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. *DOUBLECORTIN*, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998; 92: 63-72.
9. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns W, Caskey T, Ledbetter D. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature* 1993; 364: 717-21.

**FORUM PEAU HUMAINE  
ET SOCIÉTÉ**  
Lyon, mercredi 27 mai 1998



**TENTH INTERNATIONAL  
SYMPOSIUM  
ON CHOLINERGIC MECHANISMS  
DIXIÈME SYMPOSIUM INTERNATIONAL  
SUR LES MÉCANISMES  
CHOLINERGIQUES**

Arcachon, France, 1<sup>er</sup>-5 septembre 1998

• Les Symposiums Internationaux sur les Mécanismes Cholinergiques (ISCM) permettent de faire le point tous les trois ans sur les avancées de la recherche fondamentale, du niveau moléculaire au niveau intégré, et sur leurs implications, notamment en pharmacologie et médecine. Le Dixième Symposium de cette série aura lieu pour la première fois en France, au Palais des Congrès d'Arcachon, du 1<sup>er</sup> au 5 septembre 1998. C'est à la station marine d'Arcachon que David Nachmansohn découvrit, en 1938, l'utilité des organes électriques de torpille pour l'analyse des synapses cholinergiques. Les sujets principaux concerneront l'organisation moléculaire, la régulation et la pharmacologie des récepteurs nicotiques et muscariniques ; les mécanismes de la dépendance nicotinique ; la structure et l'ancrage de l'acétylcholinestérase ; le locus cholinergique des gènes de la choline acétyltransférase et du transporteur vésiculaire d'acétylcholine ; le mécanisme de libération de l'acétylcholine ; les facteurs trophiques des neurones cholinergiques ; le rôle des neurones cholinergiques dans l'apprentissage et la mémoire ; la maladie d'Alzheimer, les syndromes myasthéniques et autres pathologies cholinergiques ; la toxicologie cholinergique (pesticides et agents neurotoxiques). Des tables rondes seront organisées sur différents thèmes (thérapies cholinergiques de la maladie d'Alzheimer, régulation du système cholinergique par d'autres transmetteurs, etc.).

**Les auteurs suivants donneront des conférences plénières :** Edson X. Albuquerque ; Stephen Arneric ; Marc Ballivet ; Daniel Bertrand ; Heinrich Betz ; Anders Björklund ; Steven J. Burden ; Jean Cartaud ; Jean-Pierre Changeux ; John A. Dani ; Pietro De Camilli ; Laurent Descarries ; Andrew G. Engel ; Jeffrey D. Erickson ; Alon Friedman ; Ezio Giacobini ; Stephen H. Heinemann ; Christopher Henderson ; Louis B. Hersh ; Ferdinand Hucho ; Ed C. Hulme ; Carlos Ibañez-Moliner ; Maurice Israel ; Jacques Mallet ; Jean Massoulié ; U. Jack McMahan ; André Ménez ; Emilio Merlo-Pich ; M.-Marsel Mesulam ; Danny Michaelson ; Cesare Montecucco ; David H. Moore ; Neil M. Nathanson ; Roger M. Nitsch ; Richard L. Rotundo ; Joshua R. Sanes ; Mohammed Shoab ; Israel Silman ; Steven M. Sine ; Hermona Soreq ; Peter S. Spencer ; Palmer Taylor ; Jürgen Wess ; Victor P. Whittaker ; Kazuhito Yokoyama ; Steven Younkin.

**La date limite de soumission des contributions affichées est le 15 mai 1998. Elles pourront être incluses dans un numéro spécial du Journal of Physiology Paris.**

**INFORMATIONS**

Dr Jean Massoulié, Laboratoire de Neurobiologie Moléculaire  
et Cellulaire, Cnrs URA 1857,  
École Normale Supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France  
Téléphone : (33) 1 44 32 38 91 – Fax : (33) 1 44 32 38 87  
e-mail: jean.massoulie@biologie.ens.fr  
<http://www.ensam.inra.fr/ISCM.Arcachon>