

La tyrosinémie de type I: de la tyrosine à la réplication et à la réparation de l'ADN

La tyrosinémie de type I (HTI) est une maladie récessive autosomique, dont l'incidence (1 : 50 000 en Europe) est particulièrement élevée dans certaines régions du Canada (Québec) (1 : 2 000) et en Scandinavie. Elle se manifeste, au niveau du foie et des reins, par un éventail de symptômes, dont la sévérité clinique peut varier. On observe en particulier une hépatomégalie, accompagnée de crises neurologiques sévères, ainsi que des concentrations élevées de tyrosine et de méthionine dans le plasma et dans l'urine. La tyrosinémie de type I peut se manifester sous deux formes. La forme aiguë, caractérisée par une altération des fonctions hépatiques et rénales, conduit à la mort précoce de l'enfant. La forme chronique, présentant un dysfonctionnement rénal et une cirrhose hépatique, est caractérisée par l'apparition d'un hépatocarcinome chez environ 37 % des enfants avant l'âge de deux ans [1].

La tyrosinémie de type I : une maladie héréditaire liée à un défaut du catabolisme de la tyrosine

La tyrosinémie de type I est liée à une déficience en fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) (*m/s* 1994, n° 4, p. 482), l'enzyme impliquée dans la dernière étape du catabolisme de la tyrosine (*figure 1*) [2]. Le gène codant pour la protéine FAH a été cloné. Il est situé dans la région q23-q25 du chromosome 15, et est constitué de 14 exons correspondant à un fragment d'ADN de 35 kb [3]. Le gène *FAH* provenant de nombreux patients a été séquencé, ce qui a permis de mettre en évidence l'existence

de mutations différentes selon les malades étudiés mais, jusqu'à présent, il n'a été établi aucune relation entre le type de mutation observé et la sévérité des symptômes cliniques [4].

L'absence d'activité FAH conduit à l'accumulation de métabolites de la tyrosine, en particulier de fumarylacétoacétate et de maléylacétoacétate

qui, après réduction et décarboxylation, sont transformés en succinylacétone (*figure 1*). La présence de succinylacétone dans l'urine est d'ailleurs un des moyens de diagnostic de la maladie. La protéine FAH est synthétisée principalement dans le foie, mais est présente également dans dif-

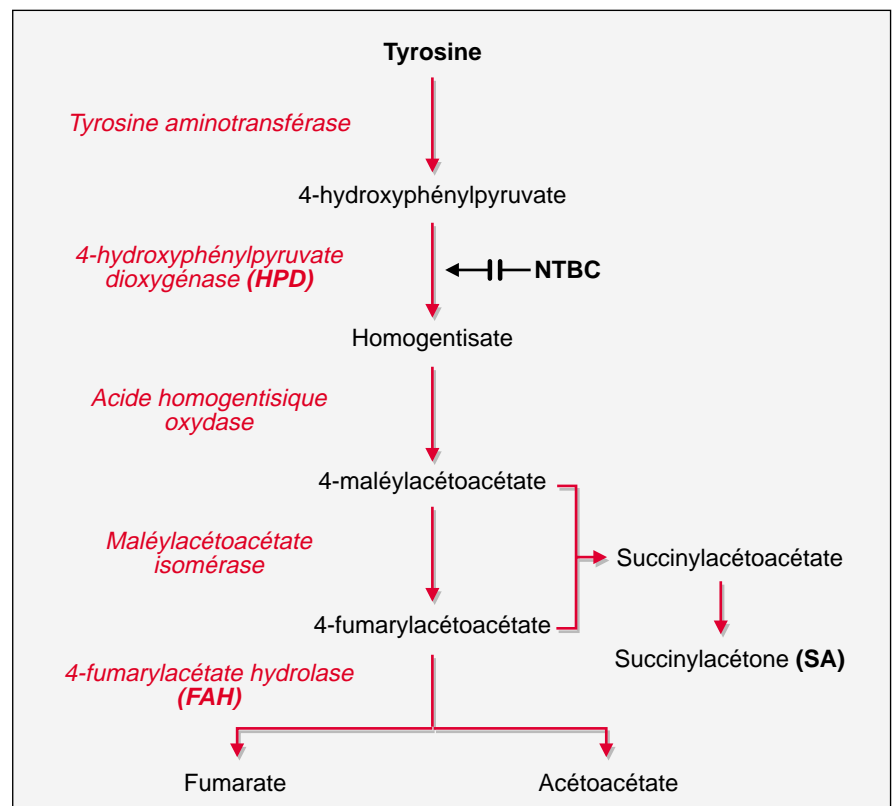


Figure 1. **Étapes du catabolisme de la tyrosine.** La tyrosinémie de type 1 est liée à un déficit en 4-fumarylacétoacétate hydrolase qui conduit à l'accumulation de métabolites, en particulier le fumarylacétoacétate et le maléylacétoacétate qui, après décarboxylation engendrent la succinylacétone. Ces métabolites forment des adduits avec le glutathion et certains acides aminés, en particulier la lysine.

férents tissus (reins, poumons, cœur, intestin...) anisi que dans différents types cellulaires (fibres musculaires, fibroblastes, cellules nerveuses...). Les métabolites anormaux de la tyrosine (fumarylacétoacétate, maléylacétoacétate et succinylacétone) peuvent donc s'accumuler dans un grand nombre de tissus et de cellules de l'organisme des malades.

Ces métabolites réagissent avec certains constituants cellulaires. Le fumarylacétoacétate réduit la concentration cellulaire en glutathion (GSH) et possède une activité mutagène sur des cellules en culture [5]. La succinylacétone forme également un adduit avec le GSH dont la concentration dans le foie des patients HTI est deux fois plus faible que la concentration mesurée chez les sujets sains [6]. Il faut souligner que le GSH joue un rôle important dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, protégeant ainsi les cellules contre les effets toxiques et/ou mutagènes de ces composés. Par ailleurs, la succinylacétone réagit avec les acides aminés pour former un adduit par l'intermédiaire d'une base de Schiff, l'acide aminé le plus réactif étant la lysine [7]. Des adduits acides aminés-succinylacétone sont présents dans l'urine des malades atteints de HTI [7].

Les traitements utilisés sont, soit une transplantation hépatique, soit un traitement par le 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC). Ce composé bloque le catabolisme de la tyrosine en inhibant la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPD), et retarde ainsi la progression de la dégénérescence hépatique (figure 1). Cependant, des souris déficientes en FAH traitées par le NTBC survivent mais développent un hépatocarcinome dans un nombre non négligeable de cas [8], suggérant que l'inhibition de la protéine HPD par le NTBC n'est pas toujours totale. La transplantation reste donc le traitement de choix de cette maladie.

Des souris transgéniques comme modèle de la tyrosinémie

Deux types de souris déficientes en activité FAH sont connus. Des souris

transgéniques *Fah*^{-/-} ont été construites, mais elles meurent durant la période néonatale avec un phénotype différent de celui des patients HTI [8]. Les autres sont les souris albinos *c*^{14CoS}, qui présentent une large délétion du chromosome 7 induite par les rayons X. Cette délétion inclut le locus *albinos* et le gène *Fah* [9]. Ces souris meurent très rapidement, mais leur durée de vie est augmentée si on les transfecte avec le gène *Fah* [10]. Des souris *c*^{14CoS} dont le gène *Hpd* (figure 1) a également été muté (*Fah*^{-/-}, *Hpd*^{-/-}) semblent normales et ne présentent pas de lésions hépatiques. En revanche, le traitement de ce double mutant avec de l'acide homogentisique, injecté par voie intrapéritonéale, restaure les dernières étapes du catabolisme de la tyrosine jusqu'au stade fumarylacétoacétate : on observe alors une dégradation du foie ainsi que l'excrétion de succinylacétone [11]. Cette expérience montre que l'accumulation des métabolites ultimes de la tyrosine (fumarylacétoacétate, maléylacétoacétate et succinylacétone) est à l'origine des dégradations observées dans les cellules et par conséquent dans le foie des patients atteints de HTI.

Par ailleurs, l'expression de la protéine HPD dans le foie des souris double mutants *Fah*^{-/-}, *Hpd*^{-/-}, à l'aide d'un adénovirus contenant l'ADNc codant pour cette protéine, permet de réactiver le catabolisme de la tyrosine (*m/s* 1996, n° 5, p. 652). Il en résulte une mort rapide et massive des hépatocytes, par un processus d'apoptose [12]. Un des métabolites, le fumarylacétoacétate, induirait la libération de cytochrome C à partir des mitochondries, activant ainsi les différentes caspases cellulaires, conduisant à la mort par apoptose [12]. Il faut noter que le foie des malades atteints de HTI est constitué de nodules en régénération séparés par du tissu fibreux, suggérant que, chez les malades, il existe également un processus de mort cellulaire qui est suivi par une régénération.

Rôle toxique des métabolites de la tyrosine

Étant donné que la succinylacétone réagit avec les acides aminés, et parti-

culièrement avec la lysine, on pouvait se demander si elle réagissait aussi avec les résidus lysine présents dans le site actif des protéines et modifiait éventuellement l'activité de telles protéines. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'étudier l'activité des ADN-ligases, pour deux raisons essentielles : d'une part, le site actif des différentes ADN-ligases eucaryotes est un résidu lysine et, d'autre part, ces protéines jouent un rôle primordial dans le métabolisme de l'ADN, puisqu'elles relient les interruptions de la molécule formées au cours des processus de réplication, de réparation et de recombinaison [13]. Une possible influence de la succinylacétone sur l'activité des ADN-ligases était suggérée par l'observation d'un grand nombre de cassures chromosomiques dans les fibroblastes provenant de malades atteints de HTI [14].

L'activité ADN-ligase totale mesurée dans des extraits de fibroblastes HTI correspondait à environ 20 % de l'activité présente dans des fibroblastes normaux. Cette faible activité résulte probablement de la présence de succinylacétone dans les cellules puisque (1) une ADN-ligase purifiée est inhibée par la succinylacétone (l'activité diminue de 50 % en présence de 10 µM de succinylacétone) et (2) l'activité présente dans des extraits de cellules normales est également inhibée par ajout de succinylacétone. [15]. Il faut noter qu'une concentration de succinylacétone variant de 5 à 50 µM a été mesurée dans le plasma de malades atteints de HTI.

Parmi les différentes ADN-ligases identifiées et caractérisées dans les cellules de mammifères, l'ADN-ligase I est la plus abondante, représentant environ 80 % de l'activité totale [13], et est impliquée dans la liaison des fragments d'Okazaki au cours de la réplication. Or cette liaison est effectuée plus lentement dans les fibroblastes HTI que dans les fibroblastes normaux [15]. La ligase III est impliquée dans la dernière étape des processus mis en œuvre au cours de la réparation de l'ADN. Or les fibroblastes HTI présentent une hypersensibilité, mesurée *in vitro*, vis-à-vis de nombreux agents qui endommagent l'ADN, tels

que les rayons ultraviolets ou les agents alkylants. L'inhibition de l'activité ADN-ligase mesurée dans les fibroblastes HTI joue donc un rôle important dans la viabilité de ces cellules.

Une lignée cellulaire (46BR) a été isolée à partir d'un patient présentant un retard de croissance, une sensibilité aux rayons UV et une déficience immunitaire sévère. Ces cellules sont sensibles aux agents qui endommagent l'ADN, joignent les fragments d'Okazaki avec une faible efficacité et possèdent une faible activité ADN-ligase I: elles ont donc des propriétés qui rappellent celles des cellules HTI. La séquence de l'ADNc codant pour la ligase I dans les cellules 46BR a montré la présence de mutations dans ce gène. Au contraire, dans les cellules HTI, aucune mutation n'a été détectée dans cet ADNc et son niveau de transcription est identique à celui mesuré dans des cellules normales [15]. Bien que les cellules HTI et 46BR soient toutes deux déficientes en activité ADN-ligase I, les symptômes associés à ces deux maladies sont différents. Il est donc vraisemblable que les métabolites de la tyrosine, outre leur effet inhibiteur sur l'activité des différentes ADN-ligases, ont d'autres effets délétères sur les cellules.

Conclusions

Bien que la tyrosinémie de type I soit une maladie liée à une mutation dans un gène impliqué dans le métabolisme d'un acide aminé, la tyrosine, ce défaut conduit à un dérèglement du métabolisme de l'ADN, comme l'a montré l'étude de l'ADN-ligase. L'influence des métabolites de la tyrosine sur d'autres enzymes intervenant dans le métabolisme de l'ADN est actuellement en cours d'étude, en particulier dans le cas d'enzymes dont le site actif est une lysine. Que ce dérè-

glement conduise à la formation des cassures chromosomiques observées dans les cellules des malades et au nombre élevé d'hépatocarcinomes est une hypothèse qui reste à vérifier ■

RÉFÉRENCES

1. Dehner LP, Snover DC, Sharp HL, Ascher N, Nakhel R, Day D. Hereditary tyrosinemia type I (chronic form): pathologic findings in the liver. *Hum Pathol* 1989; 20: 149-58.
2. Lindbald B, Lindstedt S, Steen G. On the enzymatic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 4641-5.
3. Phaneuf D, Labelle Y, Bérubé D, Arden K, Cavenee W, Gagné R, Tanguay RM. Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia: assignment of the gene to chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 525-35.
4. Phaneuf A, Lambert M, Laframboise R, Mitchell G, Lettre F, Tanguay RM. Type I hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a french canadian patient. *J Clin Invest* 1992; 90: 1185-92.
5. Jorquera R, Tanguay RM. The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 42-8.
6. Stoner E, Starkman H, Wellner D, Wellner VP, Sassa S, Rifkind AB, Grenier A, Steinerz PG, Meister A, New MI, Levine LS. Biochemical studies of a patient with hereditary hepatorenal tyrosinemia: evidence of glutathione deficiency. *Pediatr Res* 1984; 18: 1332-5.
7. Manabe S, Sassa S, Kappas A. Hereditary tyrosinemia: formation of succinylacetone-amino acid adducts. *J Exp Med* 1985; 162: 1060-74.
8. Grompe M, Lindstedt S, Al-Dhalimy M, Kennaway N, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, Ou CN, Burlingame T, Finegold M. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic-dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Nat Genet* 1995; 10: 453-60.
9. Grompe M, Al-Dhalimy M, Finegold M, Ou C, Burlingame T, Kennaway NG, Soriano P. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev* 1993; 7: 2298-307.
10. Kelsey G, Ruppert S, Beerman F, Grund C, Tanguay RM, Schütz G. Rescue of mice homozygous for lethal albino deletions: implications for an animal model for the human liver disease tyrosinemia type I. *Genes Dev* 1993; 7: 2285-97.
11. Endo F, Kubo S, Awata H, et al. Complete rescue of lethal albino c^{14CoS} mice by null mutation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and induction of apoptosis of hepatocytes in these mice by *in vitro* retrieval of the tyrosine catabolic pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 2442-6.
12. Kubo S, Sun M, Miyahara M, Umeyama K, Urakami K, Yamamoto T, Jakobs C, Matsuda I, Endo F. Hepatocyte injury in tyrosinemia type I is induced by fumarylacetoacetate and is inhibited by caspase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9552-7.
13. Lindahl T, Barnes DE. Mammalian DNA ligases. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 251-81.
14. Gilbert-Barnes E, Barnes LA, Meisner LF. Chromosomal instability in hereditary tyrosinemia type I. *Pediatr Pathol* 1990; 10: 243-52.
15. Prieto Alamo MJ, Laval F. Deficient DNA-ligase activity in the metabolic disease tyrosinemia type I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12614-8.
16. Barnes DE, Tomkinson AE, Lehman AR, Webster DB, Lindahl T. Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cell* 1992; 69: 495-503.

Françoise Laval

Directeur de recherche à l'Inserm, Inserm U. 347, Hôpital de Bicêtre, 80, rue du Général-Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France.
E.mail: laval@kb.inserm.fr.

TIRÉS À PART

F. Laval.