

Biologie cellulaire et moléculaire de l'anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi (AF) est une maladie génétique rare, caractérisée cliniquement par une anémie aplasique progressive, des anomalies du développement et une prédisposition élevée à la leucémie myéloïde aiguë. Une hypersensibilité cellulaire et chromosomique aux agents de pontage de l'ADN et un ralentissement du cycle cellulaire permettent le diagnostic pré- et post-natal de la maladie. Au moins quatre groupes génétiques de complémentation sont impliqués dans l'anémie de Fanconi. L'un des gènes en cause, *FA(C)*, localisé sur le chromosome 9, a été cloné et séquencé mais sa fonction est encore inconnue. Un gène candidat de l'AF groupe D, localisé sur le chromosome 11, a été récemment isolé. L'implication d'un défaut de réparation dans l'AF est suggérée par l'aptitude élevée de ces cellules à subir des délétions, probablement en relation avec des anomalies de recombinaison spécifique du site. Le défaut de différenciation du système hématopoïétique est très probablement lié aux profondes altérations dans la régulation du réseau de cytokines. Il constitue l'une des nombreuses conséquences indirectes de mutations dans les gènes impliqués dans l'AF.

Ethel Moustacchi

ADRESSE

E. Moustacchi : docteur ès sciences, directeur de recherche au Cnrs, directeur de l'URA 1292 du Cnrs. Institut Curie-Biologie, 26, rue d'Ulm, 75231 Paris Cedex 05, France.

m/s n° 10, vol. 10, octobre 94

L'existence chez la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* de mutants hypersensibles aux radiations et/ou à des agents chimiques, affectés dans la réplication, la recombinaison, la mutagenèse et la réparation des lésions induites dans l'ADN, a permis de mieux définir les étapes moléculaires de ces processus et leurs interactions. Chez l'homme, la plupart des études sur la réponse aux stress génotoxiques portent sur quelques maladies héréditaires rares ayant en

commun une hypersensibilité à des dommages plus ou moins spécifiques en association avec une forte prédisposition au cancer [1]. Les mieux caractérisés de ces systèmes modèles sont le xeroderma pigmentosum (XP), l'ataxie télangiectasie (AT) et l'anémie de Fanconi (AF), respectivement hypersensibles aux ultraviolets, aux radiations ionisantes et aux agents chimiques de pontage des brins d'ADN. Les cellules dérivées de ces patients présentent en culture *in vitro* des altérations des processus de réplication, de transcription et de

RÉFÉRENCES

1. Sarasin A. Les gènes humains de la réparation de l'ADN. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 43-54
2. Alter BP. Fanconi's anemia : current concepts. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1992 ; 14 : 170-6.
3. Chaganti RSK, Houldsworth J. Fanconi anemia : a pleiotropic mutation with multiple cellular and developmental abnormalities. *Ann Genet* 1991 ; 34 : 206-11.
4. Dutrillaux B, Aurias A, Fosse AM, Buriot D, Prieur M. The cell cycle of lymphocytes in Fanconi anemia. *Hum Genet* 1982 ; 62 : 327-32.
5. Latt SA, Kaiser SA, Lojewski A, Dougherty L, Juergens L, Brefach S, Sahar E, Gustashaw K, Schreck RR, Powers M, Lalande M. Cytogenetic and flow cytometric studies of cells from patients with Fanconi's anemia. *Cytogenet Cell Genet* 1982 ; 33 : 133-8.
6. Berger R, Le Coniat M, Gendron MC. Fanconi anemia : chromosome breakage and cell cycle studies. *Cancer Genet Cytogenet* 1993 ; 69 : 13-6.
7. Strathdee CA, Duncan AMV, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including *FACC* on chromosome 9. *Nature Genet* 1992 ; 1 : 196-8.
8. Moustacchi E, Papadopoulo D, Diatloff-Zito C, Buchwald M. Two complementation groups of Fanconi's anemia differ in their phenotypic response to a DNA crosslinking treatment. *Hum Genet* 1987 ; 75 : 45-7.
9. Digweed M, Zakrzewski-Ludcke S, Sperling K. Fanconi's anemia : correlation of genetic complementation group with psoralen/UV response. *Hum Genet* 1988 ; 78 : 51-4.
10. Bootsma D, Hoeijmakers JHJ. The molecular basis of nucleotide excision repair syndromes. *Mutat Res* 1994 ; 307 : 15-23.
11. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Wagner EF, Sperling K. Deficiency of DNA ligase activity in Fanconi's anemia. *Hum Genet* 1978 ; 45 : 25-32.
12. Klocker H, Auer B, Hirsch-Kauffmann M, Altmann H, Burtcher HJ, Schweiger M. DNA repair dependent NAD⁺ metabolism is impaired in cells from patients with Fanconi's anemia. *EMBO J* 1983 ; 2 : 303-7.
13. Scovassi AI, Stefanini M, Izzo R, Lagomarsini P, Bertazzoni U, Moustacchi E. The basal and the mutagen-induced levels of ADP-ribosyl transferase activity are not modified in Fanconi's anemia cells. *Mutat Res* 1989 ; 225 : 65-9.
14. Poot M, Epe B, Hoehn H. Cell cycle effects of the DNA topoisomerase inhibitors camptothecin and m-AMSA in lymphoblastoid cell lines from patients with Fanconi anemia. *Mutat Res* 1992 ; 270 : 185-9.
15. Papadopoulo D, Averbek D, Moustacchi E. The fate of 8-methoxy-psoralen-photo-induced DNA interstrand cross-links in Fanconi's anemia cells of defined genetic complementation groups. *Mutat Res* 1987 ; 184 : 271-80.

réparation en absence de dommages et/ou après leur induction. Dans ce cadre général, l'AF, caractérisée à la fois par une insuffisance progressive de la moelle osseuse, par une prédisposition à la leucémie myéloïde aiguë et par un défaut de gestion des lésions de l'ADN, présente un intérêt particulier.

Aspects cliniques et génétiques

Le phénotype de l'AF manifeste une hétérogénéité considérable, l'aspect invariable étant l'anémie aplasique progressive. L'âge médian d'apparition de celle-ci est de 8 ans ; elle peut être présente dès quelques mois après la naissance, mais on relève au moins un cas où l'anémie s'est déclarée à 48 ans. Des malformations congénitales du squelette et de l'appareil urinaire, des anomalies multiples du développement, une hyperpigmentation ou des taches café-au-lait accompagnent, dans 60 % à 70 % des cas, la pancytopenie. Le traitement de l'aplasie par transfusion et par des androgènes prolonge la survie d'environ six ans après le diagnostic. La greffe de moelle allogène, quand elle est possible, reste pour le moment le traitement de choix. Les complications majeures incluent la leucémie myéloïde aiguë et le carcinome hépatique [2].

Le caractère progressif de l'apparition des troubles hématologiques rend le diagnostic de l'AF parfois difficile. D'application pré- et post-natale, celui-ci est essentiellement fondé sur l'augmentation de la fréquence des ruptures chromosomiques par des produits pontant l'ADN, tels que le diepoxybutane, la mitomycine-C (MMC) ou les moutardes azotées. La comparaison de lymphocytes de donneurs normaux et AF, stimulés à la phytohémataglutinine, traités *in vitro*, montre un net accroissement des réarrangements chromosomiques, des figures triradiales et quadriradiales et des endoreduplications chez les patients AF [3].

L'accumulation de cellules en phase G₂/M du cycle est également une caractéristique de l'AF [4, 5]. Celle-ci est accentuée par un traitement à la moutarde azotée et peut être

mesurée par cytofluorimétrie [6]. Cette méthode récente de diagnostic, d'application rapide, mériterait d'être validée dans différents laboratoires.

L'AF a une prévalence de l'ordre de 1 pour 350 000 dans l'hémisphère Nord et la fréquence des hétérozygotes est estimée à 1 pour 200. Ces estimations sont peut-être sous-évaluées car, dans une étude récente du *National Institute of Health* aux États-Unis, 10 % des patients en traitement pour une « anémie aplasique acquise » et d'apparence physique normale se sont révélés atteints d'AF sur la base du test d'induction de cassures chromosomiques.

Au plan génétique, il a été démontré que l'AF est une maladie à transmission autosomique récessive sans déviation significative d'une ségrégation mendélienne monofactorielle. L'analyse par hybridation somatique a permis de suggérer l'existence d'au moins quatre groupes génétiques de complémentation fonctionnelle [7]. Des marqueurs de sélection stables (résistance à l'hygromycine et au G418) portés par des plasmides ont été introduits par transfection dans sept lignées lymphoblastoïdes dérivées de patients AF ; celles-ci ont été ensuite hybridées dans les différentes combinaisons possibles. Le critère de complémentation a été l'inhibition de croissance à la MMC dans les hybrides formés par fusion au polyéthylène glycol et sélectionnés. Étant donné le faible nombre de lignées examinées, le degré d'hétérogénéité génétique est très probablement supérieur à 4. De plus, il serait nécessaire d'évaluer la complémentation de manière plus complète, en particulier à l'aide du test d'induction de cassures chromosomiques comme cela a été initialement pratiqué pour la première classification en groupes A et non A (anciennement « groupe B », subdivisé à présent en B, C, D). Il est à noter que les groupes B, C, D diffèrent du groupe A par leur réponse en terme de blocage de synthèse d'ADN après un traitement pontant ; en effet, ce blocage s'est révélé irréversible seulement pour le groupe A [8]. Confirmée dans différents laboratoires [9], cette méthode permet un pré-classement rapide en groupes A (près de 15 % des lignées d'origi-

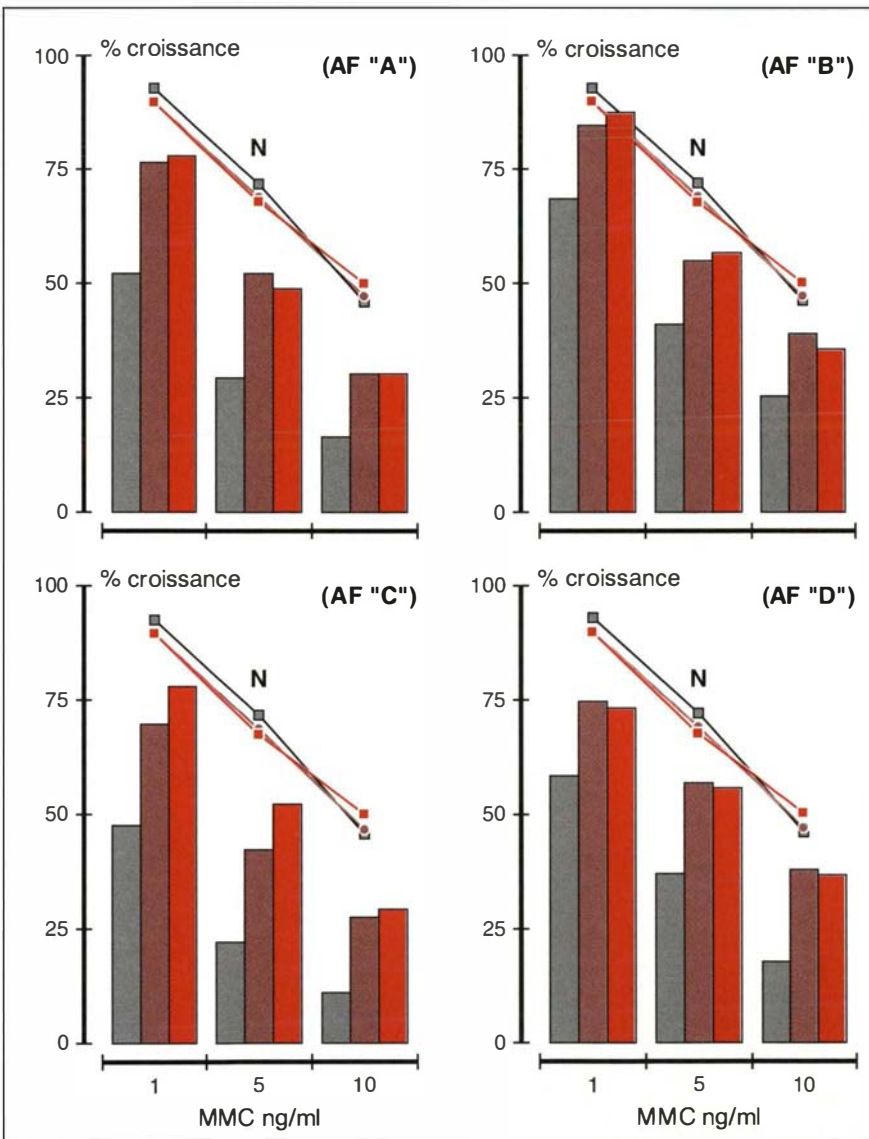


Figure 1. Effet de l'IL6 et des anticorps anti-TNF α sur l'inhibition de la croissance en fonction de la concentration en ng/ml de mitomycine-C (MMC) dans des cellules AF des quatre groupes génétiques de complémentation (A, B, C, D). Les histogrammes correspondent aux cellules traitées à la MMC, (colonne grisée), cellules traitées à la MMC avec addition d'IL6 (100 u/ml) (colonne bistre), cellules traitées à la MMC avec addition d'anticorps anti-TNF α (quantité nécessaire pour neutraliser 100-u/ml de TNF α) (colonne rouge). Les courbes se rapportent aux cellules normales (N) traitées de la même manière (droites superposées, grise, bistre et rouge). (D'après [26].)

m/s n° 10, vol. 10, octobre 94

ne géographique différente examinées jusqu'ici) et non A.

L'hétérogénéité génétique présente dans l'AF rappelle la situation observée dans l'XP et l'AT. Celle-ci reflète probablement la complexité de la machinerie enzymatique impliquée dans la gestion des lésions de l'ADN. Il n'est aussi pas exclu que ces syndromes de phénotype différent soient dus, au moins pour certains d'entre eux, à des altérations alléliques du même gène. Il a été décrit récemment qu'un défaut dans un seul gène peut être à l'origine de trois syndromes : XP, XP et syndrome de Cockayne, ou une forme particulière de la trichothiodystrophie photosensible ou PIBIDS [10]. Le rôle central joué dans l'économie cellulaire par certains facteurs de transcription ubiquitaires interagissant au sein d'un complexe enzymatique de réparation incite à rechercher une validation plus large de cette possibilité. La fonction des gènes impliqués dans l'AF, comme ceux de l'AT, maladie présentant des similitudes au moins au plan des propriétés cellulaires, reste à ce jour inconnue.

Le devenir des lésions de l'ADN dans l'AF et conséquence mutagène

L'hypersensibilité cellulaire et chromosomique aux agents de pontage de l'ADN et l'accentuation des anomalies du cycle cellulaire induites par ces agents dans l'AF suggèrent fortement que le défaut de base dans cette maladie concerne directement ou indirectement une anomalie de réparation de l'ADN. Parmi les diverses enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN lésé, des défauts en ADN ligase [11] ou en poly(ADP) ribosyltransférase [12] ont été suggérés. Des études récentes plus complètes n'ont cependant pas permis de déceler de différences significatives dans l'activité de ces enzymes entre cellules normales et AF [13]. De même, la recherche d'effets différentiels d'inhibiteurs des ADN topo-isomérases I et II ne révèle pas d'anomalies dans l'AF [14] (Rosselli *et al.*, soumis pour publication), sans toutefois exclure l'existence possible de voies alterna-

RÉFÉRENCES

16. Rousset S, Nocentini S, Revet B, Moustacchi E. Removal of psoralen photo-induced DNA cross-links in normal and Fanconi's anemia fibroblasts : a molecular analysis by electron microscopy. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 2443-8.
17. Rousset S, Nocentini S, Santella RM, Gasparro FP, Moustacchi E. Immunological probing of induction and repair of 8-methoxypsoralen photo-adducts in DNA from Fanconi anemia and normal human fibroblasts : quantitative analysis by electron microscopy. *J Photochem Photobiol Part B* 1993 ; 18 : 27-34.
18. Papadopoulo D, Porfirio B, Moustacchi E. Mutagenic response of Fanconi's anemia cells from a defined complementation group after treatment with photo-activated bifunctional psoralens. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 3289-94.
19. Guillouf C, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulo D. Mutagenic processing of psoralen monoadducts differ in normal and Fanconi anemia cells. *Mutagenesis* 1993 ; 8 : 355-61
20. Papadopoulo D, Guillouf C, Mohrenweiser H, Moustacchi E. Hypomutability in Fanconi anemia cells is associated with increased deletion frequency at the *HPRT* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 8383-7.
21. Sala-Trepat M, Boyse J, Richard P, Papadopoulo D, Moustacchi E. Frequencies of *HPRT* mutants in T-lymphocytes and of glycophorin-A variants in erythrocytes of Fanconi anemia patients and control donors. *Mutat Res* 1993 ; 289 : 115-26.
22. Papadopoulo D, Laquerbe A, Guillouf C, Moustacchi E. Molecular spectrum of mutations induced at the *HPRT* locus by a cross-linking agent in human cell lines with different repair capacities. *Mutat Res*, 1993 ; 294 : 167-77.
23. Coppey J, Sala-Trepat M, Lopez B. Multiplicity reactivation and mutagenesis of trimethylpsoralen-damaged herpes virus in normal and Fanconi's anemia cells. *Mutagenesis* 1989 ; 4 : 67-71.
24. Meyn MS. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in ataxia-telangiectasia. *Science* 1993 ; 260 : 1327-30.
25. Rosselli F, Sanceau J, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production : a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. I : Involvement of interleukin-6. *Hum Genet* 1992 ; 89 : 42-8.
26. Rosselli F, Sanceau J, Gluckman E, Wietzerbin J, Moustacchi E. Abnormal lymphokine production : a novel feature of the genetic disease Fanconi anemia. II : Spontaneous overproduction of tumor necrosis factor α . A possible tool in detecting heterozygous individuals. *Blood* 1994 ; 83 : 1216-25.
27. Bagby GC, Segal GM, Auerbach AD, Onega T, Keeble W, Heinrich MC. Constitutive and induced expression of hematopoietic growth factor genes by fibroblasts from children with Fanconi anemia. *Exp Hematol* 1993 ; 21 : 1419-26.

tives de substitution à celle bloquée par les inhibiteurs.

L'incision des pontages interbrins de l'ADN et celle de certains adduits encombrants ont été examinées par des techniques biochimiques variées et sur des lignées d'origine génétique différente. Des résultats apparemment contradictoires allant d'une absence complète d'incision à une capacité pratiquement normale ont été rapportés. En plus de l'hétérogénéité génétique, de nombreux facteurs, tels que les phases de croissance, le nombre de passages (pour les fibroblastes de peau), la tension d'oxygène lors de la croissance, semblent jouer un rôle dans la gestion des lésions dans l'AF.

Sur la base de données obtenues par élution alcaline [15], ou par analyse de la synthèse d'ADN après traitement pontant [8] et par immunomicroscopie électronique à l'aide d'anticorps dirigés contre les lésions [16, 17], on voit que les lignées AF du groupe génétique A montrent une efficacité moindre et une cinétique plus lente d'élimination des pontages que les lignées non A. De plus, la sensibilité établie en terme de survie clonogénique est corrélée à la capacité à inciser les pontages interbrins.

Les différences de mutabilité induite *in vitro* ou observée *in vivo* chez les patients AF [18-21] traduisent très probablement des anomalies dans la fidélité de la réparation de l'ADN.

Nous avons, en effet, démontré que la fréquence des mutations induites par la photoaddition des psoralènes (pontages et monoadditions) à deux *loci* différents dans les lignées FA(A) et FA(D) examinées est inférieure à celle observée dans des lignées normales. Dans ces dernières, la plupart des mutations sont de nature ponctuelle (substitution de bases, etc.). En revanche, dans le cas de l'AF, l'analyse moléculaire des mutants induits au *locus HPRT* montre que la majorité d'entre eux sont dus à des délétions spécifiques du site et à des réarrangements [20-22]. Les rares mutations ponctuelles sont, dans le cas de l'AF, de même type que dans les cellules normales. De même, la réparation des brins transcrits reste préférentielle dans les cellules AF comme dans les cellules normales (Tableau I). Fait important, l'analyse au niveau de la séquence des jonctions de délétions suggère la présence anormale dans les cellules AF d'une activité de recombinaison spécifique du site. Celle-ci partagerait certaines caractéristiques avec l'activité de type V(D)J recombinase mise en œuvre dans l'assemblage, au cours de la différenciation du système immunitaire, d'éléments génétiques séparés (gènes des immunoglobulines Ig et des récepteurs des cellules T). Les séquences cibles de ces réarrangements spécifiques sont en partie retrouvées au niveau des sites de délétion des cellules AF,

Tableau I

COMPARAISON DE LA RÉPONSE A L'INDUCTION DE MUTATIONS AU LOCUS *HPRT* DE CELLULES D'ANÉMIE DE FANCONI ET DE CELLULES DE DONNEURS NORMAUX

	Cellules normales	Cellules AF
Mutabilité	S = 37 %, MF x 7 Normale	S = 37 %, MF x 3 Hypomutabilité
Nature moléculaire des mutations	Substitutions	Délétions
Localisation des mutations ponctuelles	Ciblées : (AT), 5'TpA	Ciblées : (AT), 5'TpA
Réparation préférentielle du brin transcrit	Compétente	Compétente

Les mutations *HPRT* ont été produites par la photoaddition de psoralène (production de pontages interbrins de l'ADN et monoadditions sur les pyrimidines) [20, 22]. S : survie ; MF : fréquence de mutations.

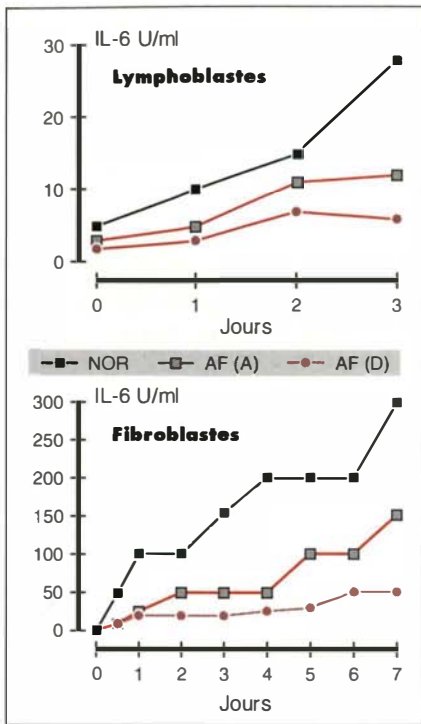


Figure 2. Production d'interleukine 6 en fonction du temps dans des lymphoblastes normaux (courbes noires, AHH-1) ou dérivés de donneurs AF (courbes rouges, HSC-99, groupe A ; HSC-62, groupe D) et dans des fibroblastes dérivés des mêmes donneurs. L'IL6 est mesurée dans le milieu de culture à différents temps au cours de la croissance [25].

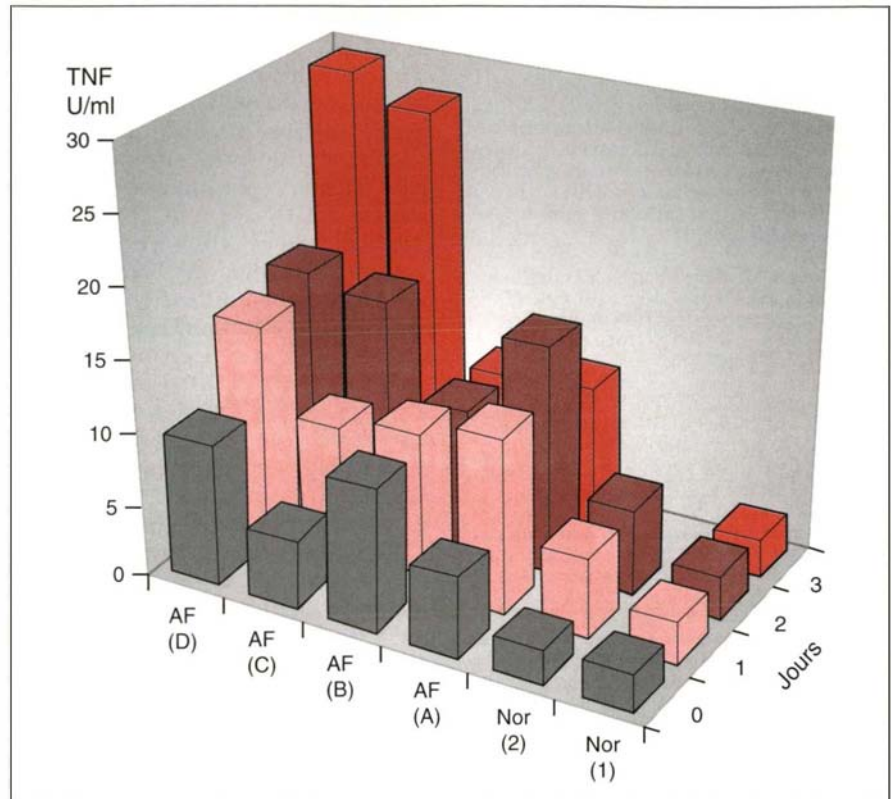


Figure 3. Production de $TNF\alpha$ dans deux lignées normales (1, AHH-1 ; 2, GM3657) et dans quatre lignées AF appartenant aux différents groupes génétiques de complémentation [26].

alors qu'elles ne sont pas présentes dans les cellules normales (Papadopoulo *et al.*, soumis pour publication).

De même, a été constatée une augmentation par rapport à la normale de la multiplicité de réactivation dans des cellules AF infectées par le virus Herpès traitées *in vitro* par les psoralènes photoactivés. Là aussi, une activité recombinogène anormalement exprimée serait révélée par ce système [23]. Des augmentations de la fréquence de recombinaison entre séquences homologues ont été récemment rapportées dans le cas de l'AT [24] et sont à rapprocher de celles décrites dans l'AF. L'analyse à l'aide de constructions extrachromosomiques appropriées et d'extraits cellulaires AF, AT et en combinaison permettra, dans un proche avenir, de documenter ces notions.

Anomalies de production de cytokines

Au cours de ces dernières années, il a été montré qu'une variété de protéines ayant des fonctions multiples de contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire peuvent intervenir aussi dans la réponse cellulaire au stress génotoxique. A la suite d'expériences montrant que les surnageants de culture de cellules normales sont capables de corriger la réponse à la MMC, par exemple, de cellules AF, nous avons été conduits à déterminer la production de différentes cytokines par les cellules. Il s'avère que l'addition d'interleukine 6 au milieu de culture de cellules AF des divers groupes génétiques de complémentation augmente leur résistance aux effets cytotoxiques de la MMC (figure 1), et

cela de manière dépendante de la dose d'IL6. La titration de l'IL6 dans le milieu de culture met en évidence une augmentation progressive de cette interleukine au cours de la croissance de cellules normales ; or, cette accumulation d'IL6 est bien moindre dans les cellules AF (figure 2) ; cette différence explique la restitution d'une réponse pratiquement normale par l'addition d'IL6 au milieu (figure 1) [25]. Parallèlement à la réduction de l'IL6, une production anormalement élevée du facteur nécrosant des tumeurs ($TNF\alpha$) est observée dans l'AF (figure 3). L'addition d'anticorps anti- $TNF\alpha$ au milieu de culture corrige la sensibilité cellulaire et chromosomique des cellules AF aux agents pontants (figure 1) [26].

L'IL6 est une protéine multifonctionnelle qui intervient, entre autres,

RÉFÉRENCES

28. Mann WR, Venkatraj VS, Allen RG, Liu Q, Olsen DA, Adler-Brecher B, Mao JI, Weif-
fenbach B, Sherman SL, Auerbach AD. Fanconi anemia : evidence for linkage heterogeneity on chromosome 20q. *Genomics* 1991 ; 9 : 329-37.
29. Diatloff-Zito C, Rosselli F, Heddle J, Moustacchi E. Partial complementation of the Fanconi anemia defect upon transfection by heterologous DNA. Phenotypic dissociation of chromosomal and cellular hypersensitivity to DNA cross-linking agents. *Hum Genet* 1990 ; 86 : 151-61.
30. Digweed M, Gunthert U. Recombinant selection by micro-injection : a simple cDNA cloning procedure for the production of exclusively sense RNA transcripts. *Gene* 1989 ; 83 : 147-52.
31. Zdzienicka MZ, Arwert F, Neuteboom I, Rooimans M, Simons JWIM. The Chinese hamster V79 cell mutant V-H4 is phenotypically like Fanconi anemia cells. *Somatic Cell Mol Genet* 1990 ; 16 : 575-81.
32. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anemia by functional complementation. *Nature* 1992 ; 356 : 763-7.
33. Gavish H, dos Santos CC, Buchwald M. A Leu₅₅₄-to-Pro substitution completely abolishes the functional complementing activity of the Fanconi anemia (FACC) protein. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 123-6.
34. Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew CG. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anemia group C gene. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 797-9.
35. Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation of the FACC gene causes Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Nature Genet* 1993 ; 4 : 202-5.
36. Gibson RA, Buchwald M, Roberts RG, Mathew CG. Characterization of the exon structure of the Fanconi anemia group C gene by vectorette PCR. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 35-8.
37. Murer-Orlando M, Lierena Jr JC, Birjandi F, Gibson RA, Mathew CG. FACC gene mutations and early prenatal diagnosis of Fanconi's anemia. *Lancet* 1993 ; 342 : 686.
38. Wevrick R, Clarke CA, Buchwald M. Cloning and analysis of the murine Fanconi anemia group C cDNA. *Hum Mol Genet* 1993 ; 2 : 655-62.
39. Wevrick R, Barker JE, Nadeau JH, Szpirer C, Buchwald M. Mapping of the murine and rat FACC genes and assessment of flexed-tail as a candidate mouse homolog of Fanconi anemia group-C. *Mamm Genome* 1993 ; 4 : 440-4.
40. Diatloff-Zito C, Duchaud E, Viegas-Pequignot E, Fraser D, Moustacchi E. Identification and chromosomal localization of a DNA fragment implicated in the partial correction of the Fanconi anemia group D cellular defect. *Mutat Res* 1994 ; 307 : 33-42.

à plusieurs niveaux dans le processus de différenciation et de maturation du système hématopoïétique. Quant au TNF α , il a été isolé pour son activité cytotoxique et cytotatique sur les cellules tumorales ; ce messager extracellulaire peut également jouer un rôle dans la stabilité de l'ADN en interférant avec l'activité de la topoisomérase II. Cette enzyme impliquée dans la réplication et la réparation de l'ADN est une composante essentielle de la structure des chromosomes. De plus, le TNF α contribue à la fragmentation de l'ADN par l'activation d'endonucléases pouvant aboutir à la mort cellulaire par apoptose. Or, des expériences récentes montrent des anomalies dans les fréquences spontanées et induites par les radiations de cellules apoptotiques dans l'AF (Rosselli *et al.*, soumis pour publication). L'altération de la régulation de l'IL6 peut expliquer la dépression des fonctions médullaires et la pancytopenie observée chez les patients AF. Celle du TNF α peut être en cause dans la fragilité chromosomique des cellules AF. Il est important de noter que l'analyse par *Southern blot* des gènes de l'IL6 et du TNF α et le séquençage de la région 3' non traduite du mRNA du gène du TNF α ne mettent en évidence aucune différence entre donneurs AF et donneurs normaux. Les anomalies dans la production de ces deux cytokines seraient donc des effets importants, mais indirects, des mutations AF. Plus récemment, d'autres anomalies dans l'expression constitutive ou induite d'autres facteurs de croissance du système hématopoïétique (G-CSF et M-CSF) ont été rapportées [27]. Là encore, les auteurs concluent à un effet indirect des mutations AF.

Le clonage des gènes de l'AF

La fonction du gène normal muté dans l'AF reste, pour le moment, inconnue. Aussi le clonage de ce gène, suivi d'une recherche d'homologie avec des gènes de levure, de drosophile ou de souris et de hamster remplissant la même fonction ainsi que la perspective favorable de thérapie génique à l'aide de cellules hématopoïétiques ont largement sti-

mulé cette recherche difficile et longtemps infructueuse. Plusieurs stratégies ont été adoptées dans cet objectif.

1. Mettant à profit l'existence de marqueurs dispersés sur pratiquement tout le génome humain, la recherche systématique de marqueur génétique (sondes anonymes ou correspondant à des gènes non impliqués dans l'AF) étroitement lié à l'AF a été effectuée par une étude de liaison dans des familles où ségrège la maladie. Ce type d'approche a conduit à proposer une localisation de l'un des gènes de l'AF sur le chromosome 20q [28]. Cependant, l'importante hétérogénéité génétique de la maladie, les faibles probabilités de liaison (*lod score**) trouvées et une contradiction interne dans les positionnements rapportés ne permettent pas d'aboutir à des conclusions fermes. De plus, les distances trop grandes entre les sites interdisent pour le moment la "marche" le long du chromosome.

2. La recherche de complémentation fonctionnelle de cellules AF [29, 30] ou de mutants cellulaires de hamster de type AF à l'aide d'ADN génomique hétérologue [31] ou d'ADNc [32] a été tentée. Pour le moment, c'est cette dernière approche qui s'est révélée la plus fructueuse. L'utilisation d'une banque d'expression d'ADNc dans un vecteur navette EBV porteur de marqueurs de sélection (résistance à l'hygromycine et à l'ampicilline), transfecté dans des lymphoblastes AF de groupe génétique de complémentation défini par hybridation somatique, a permis le clonage de l'ADNc du groupe C par l'équipe de Buchwald [32]. Ce gène désigné FACC restitue un phénotype sauvage aux cellules FA(C), en terme de sensibilité à l'effet cytotoxique de la MMC ou du diepoxybutane. L'ADNc a été séquençé (4 566 paires de bases ou pb) et comporte une phase ouverte de lecture de 1 674 bp correspondant à un polypeptide prévu

* La méthode des lod score (logarithme décimal des probabilités de liaison) permet d'additionner les résultats obtenus pour chaque famille et de calculer les probabilités de liaison pour différentes fréquences de recombinaison.

de 557 amino acides sans motif commun avec une protéine connue. L'analyse de la séquence codante montre qu'elle comporte 14 exons de 53 à 204 bp chacun [32]. Le gène a été localisé sur le chromosome 9q22.3 [7]. Trois mutations du gène FACC ont été décrites à ce jour. Il s'agit d'une substitution de leucine 554 à proline dans l'un des allèles de la lignée (C) dérivée d'un patient AF [33] et de la délétion d'une seule guanine dans deux autres lignées de groupe de complémentation inconnu. Enfin, tout récemment, une substitution de C→T a été localisée en position 808 qui change un résidu arginine en un codon de terminaison de traduction de l'exon 6 (la protéine tronquée aurait un tiers de la taille de la protéine normale) [34]. Le patient analysé est homozygote pour cette mutation non-sens et les parents sont hétérozygotes. Ces travaux montrent que la classification moléculaire des patients AF, au moins pour le groupe C, devient possible [35-37]. Dans le but de construire un modèle souris, il est à noter que l'ADNc homologue murin de l'AF vient d'être cloné [38, 39] ; il comporte 79 % de similarité de séquence d'acides aminés avec l'ADN humain et, en dépit de la divergence, son expression dans des cellules AF(C) restaure un phénotype normal de résistance aux agents pontants.

L'utilisation de la complémentation fonctionnelle de cellules AF du groupe de complémentation D par de l'ADN génomique de souris a permis récemment de cloner un fragment d'ADN correcteur de l'hypersensibilité à la MMC [29, 40]. Par hybridation *in situ*, on montre que cet ADN est localisé sur le chromosome 11q23 [40]. Il est à noter que des gènes de l'AT sont également localisés dans la même région. L'ADNc du gène candidat du groupe D de l'AF a été cloné et séquencé. La recherche d'homologie montre qu'il correspond à une protéine moteur, la dynamine HDYN2. Il s'agit d'une protéine liant le GTP impliquée, entre autres fonctions, dans la partition des chromosomes et l'endocytose (Diatloff-Zito *et al.*, soumis). La recherche de mutations dans l'ADN des cellules AF(D) est en cours. La transfection de cet

ADNc entraîne, dans des cellules normales et AF(D), un ralentissement de la croissance et une réduction de la capacité à former des colonies ; cette propriété empêche donc, pour le moment, de conclure définitivement quant à la correction du défaut.

Les autres approches, telles que la complémentation de mutants de hamster qui s'est révélée si fructueuse pour le clonage des gènes *ERCC*, qui contrôlent l'excision resynthèse et sont impliqués dans l'XP, n'ont pas permis pour le moment d'aboutir au clonage de gènes de l'AF.

Conclusions et perspectives

Au cours des cinq dernières années, de nouvelles caractéristiques de l'AF sont venues s'ajouter à un phénotype déjà pléiotrope. Il s'agit, d'une part, d'une forte aptitude à subir des délétions, probablement en relation avec des anomalies de recombinaison spécifique du site et, d'autre part, d'altération dans la régulation du réseau de cytokine à relier au défaut de différenciation du système hématopoïétique. La première de ces propriétés est peut-être à l'origine des grandes difficultés rencontrées par plusieurs équipes dans le clonage des gènes de l'AF. Celles-ci ont été en partie surmontées et ont abouti à l'identification du gène AF(C) et à l'isolement d'un gène candidat de l'AF(D).

Ces travaux ouvrent la voie à l'identification des fonctions de ces gènes et au diagnostic moléculaire de la maladie. Les conséquences très variées des mutations des gènes AF indiquent qu'ils contrôlent des cascades métaboliques d'importance centrale dans les voies de différenciation et de maintien de la stabilité des génomes ■

Remerciements

Je tiens à remercier mes collaborateurs C. Diatloff-Zito, D. Papadopoulo, F. Rosselli et leurs étudiants doctorants respectifs, E. Duchaud, A. Laquerbe et A. Ridet, pour leur autorisation à citer des résultats non encore publiés.

Summary

Cellular and molecular biology of Fanconi anemia

Fanconi anemia (FA) is an autosomal recessive disorder clinically characterized by progressive bone marrow failure, multiple congenital malformations and predisposition to acute myelogenous leukemia. Increased spontaneous chromosome breakage, cellular and chromosomal hypersensitivity to DNA cross-linking agents associated to anomalies in the processing of DNA lesions and elongation of the G2 phase of the cell cycle constitute essential cellular features of the disease. Recently the existence of at least 4 complementation groups has been inferred from somatic hybridization analysis. One of the genes, *FA(C)*, has been cloned and sequenced. The function of this gene located to chromosome 9 is however still unknown. The homologue murine sequence has been recently cloned and shown to complement the sensitivity to DNA cross-linking agents of FA cells *in vitro*. A candidate gene for FA(D) located on chromosome 11q23 has been recently identified. Further attempts towards characterization of the FA defect indicated that a high proportion of deletions are produced both spontaneously and following exposure to crosslinking agents. This process appears to involve abnormal site-specific recombination. Finally, mutations in FA genes lead, indirectly, to diverse anomalies in the cytokines network (IL-6 and TNF) which may account for the defect in the differentiation of the hematopoietic system. Taken together the recent developments open new approaches to diagnosis and therapy of the FA syndrome.

TIRÉS A PART

E. Moustacchi.