

Clonage du gène responsable de la maladie de Menkes

La première description des données cliniques, neurologiques et génétiques de cette maladie a été rapportée en 1962 par Menkes [1]. La maladie de Menkes est caractérisée par une dégénérescence neurologique associée à un retard mental, un état particulier des cheveux qui sont dépigmentés et crépelés, un déficit des parois vasculaires et une évolution rapide vers une mort précoce (en général avant l'âge de 5 ans). L'hypothèse d'une anomalie du métabolisme du cuivre n'a été suggérée que dix ans plus tard par Danks sur la base d'une ressemblance entre les cheveux crépelés des enfants atteints de la maladie de Menkes et la laine de moutons élevés en Australie sur des sols de faible teneur en cuivre [2]. Cette hypothèse a été rapidement consolidée par l'observation de déficits en enzymes qui utilisent les ions cuivre comme cofacteurs et par l'établissement de corrélations entre ces déficits enzymatiques et les signes cliniques de la maladie de Menkes [3] (Tableau I). Des études biochimiques récentes utilisant des cultures de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Menkes ont montré une accumulation intracellulaire du cuivre dans tous les tissus, sauf dans le foie et les villosités choriales, et ont suggéré une anomalie du transport intracellulaire du cuivre [4].

Utilisant des stratégies différentes de génétique inverse, fondées dans tous les cas sur la caractérisation cytogénétique et moléculaire de points de cassure en Xq13.3 de deux réarrangements chromosomiques observés chez deux patients atteints de la maladie de Menkes [5], trois groupes indépendants [6-8] ont récemment isolé le gène responsable de cette maladie. Il s'agit d'un gène constitué d'au moins 14 exons répartis sur un locus

génomique en Xq13.3 d'au moins 120 kb (Chelly *et al.*, résultats non publiés). L'ARNm d'environ 8,5 kb est exprimé dans tous les tissus (sauf dans le foie où le niveau d'expression est plus faible). L'investigation du gène et de son transcrite chez les patients a révélé des délétions non chevauchantes du gène dans 16 % des cas [7] et des anomalies quantitatives et/ou qualitatives de l'ARNm dans 70 % des cas [6].

La séquence nucléotidique de l'ADNc a montré que la partie codante n'est que de 4,5 kb (52 % de l'ARNm) et a permis de prédire que le transcrite code pour une protéine de 1 500 acides aminés [6]. L'analyse assistée par

ordinateur de la séquence peptidique a suggéré que le produit du gène responsable de la maladie de Menkes est un transporteur de cation, membre de la famille des ATPases de type P (figure 1). La comparaison de la séquence peptidique à celles des banques de données a montré une très forte homologie avec l'ATPase transporteur du cuivre (Cu²⁺) d'*Enterococcus hirae* et des homologies significatives avec d'autres transporteurs de cations de procaryotes et d'eucaryotes. La protéine du gène de Menkes serait formée d'un domaine N-terminal, vraisemblablement de liaison au cuivre, contenant six répétitions du motif Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys similaires à ceux des

Tableau I

ENZYMES QUI UTILISENT LES IONS Cu²⁺ COMME COFACTEURS ET SIGNES CLINIQUES OBSERVÉS EN CAS DE DÉFICIT

Enzyme	Fonction	Conséquences cliniques
Cytochrome c oxydase	Transport d'électron (mitochondrie)	Faiblesse musculaire, troubles visuels, ataxie
Superoxyde dismutase	Détoxification des radicaux libres	Dégénérescence myélinique et spasticité
Dopamine β-hydroxylase	Production de catécholamines	Hypothermie, anorexie, somnolence, déshydratation, troubles respiratoires, hypotension, ataxie
Lysyl oxydase	Liaison entre molécules de collagène	Anomalies du tissu conjonctif : complications vasculaires, diverticules, peau et articulations flasques
Tyrosinase	Production de mélanine	Dépigmentation
Enzyme à identifier	Liaison entre molécules de kératine	Cheveux crépelés, eczéma

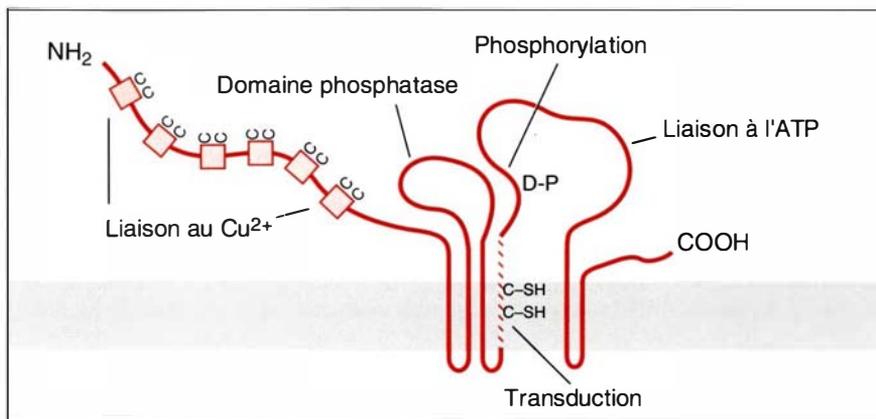


Figure 1. **Structure prédite de la protéine produite par le gène responsable de la maladie de Menkes, une ATPase de type P** [6]. Les boîtes avec les résidus cystéine (C) représentent les motifs potentiels de liaison au cuivre. D-P : correspond au résidu acide aspartique en position 1044 qui subit la phosphorylation au cours du transport du cation cuivre. Le domaine phosphatase catalyserait l'hydrolyse de ce phosphate au cours du cycle réactif associé au transport du Cu^{2+} .

opérons de résistance aux métaux lourds, tels que le Cd^{2+} et Hg^{2+} de certaines souches bactériennes (figure 2), de domaines de phosphorylation et de déphosphorylation, d'un domaine de liaison à l'ATP, typique des ATPases de type P, et de six domaines transmembranaires correspondant au canal-cation.

Les données de séquence montrent donc que le gène responsable de la maladie de Menkes code pour une protéine impliquée dans le transport du cuivre et suggèrent que les déficits en enzymes qui utilisent les ions Cu^{2+} comme cofacteurs, et qui sont responsables des troubles cliniques, résultent d'un défaut d'incorporation du cuivre au niveau des apo-enzymes. Ce mécanisme physiopathologique devrait être étayé par les études fonctionnelles et immunocytochimiques en cours.

Le taux très faible d'ARNm dans le foie adulte normal [7] et l'absence apparente de trouble de transport du cuivre dans le foie en cas de maladie de Menkes d'une part, suggèrent, que cette fonction serait assurée par un transporteur du cuivre spécifique du foie, et d'autre part, suggèrent l'hypothèse que la maladie de Wilson, caractérisée par un trouble du métabolisme du cuivre limité au foie, serait due à un défaut de cet hypothétique transporteur. Par ailleurs, l'isolement de ce gène a permis de confirmer que le syndrome d'Ehler-Danlos lié à l'X, caractérisé par des anomalies limitées au tissu conjonctif, appelé aussi Ehler-Danlos type IX ou *cutis laxa* lié à l'X [9], est une forme allélique de la maladie de Menkes. En effet, Levinson *et al.* [10] ont montré une diminution drastique du taux du transcrit du gène de Menkes dans les fibroblastes en culture de deux patients atteints de *cutis laxa* lié à l'X.

Le modèle animal équivalent à la maladie de Menkes est la mutation *mottled* de souris. L'isolement du gène responsable de cette mutation devrait faciliter la caractérisation des formes alléliques (on en connaît actuellement au moins 15) et fournir éventuellement des modèles pour le développement des applications thérapeutiques.

En conclusion, la caractérisation du gène responsable de la maladie de Menkes devrait faciliter de manière très significative le diagnostic, pratiqué

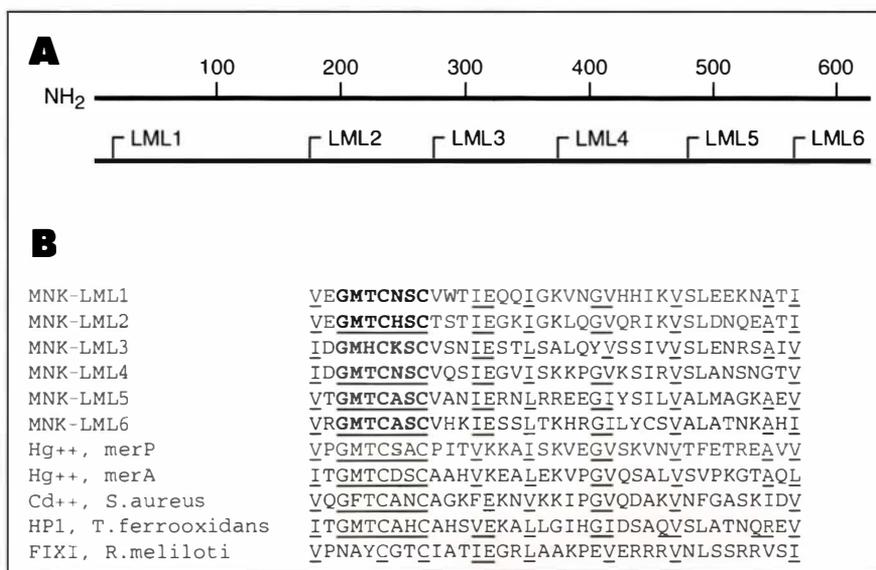


Figure 2. **Domaine potentiel de liaison au cuivre de la protéine codée par le gène responsable de la maladie de Menkes.** A. Position des motifs peptidiques conservés, GMTCSXC, dans la partie NH₂-terminale de la protéine. Ces motifs correspondent vraisemblablement aux domaines de liaison des métaux lourds (LML). B. Alignement des six répétitions de 37 acides aminés de la protéine du gène de Menkes avec les séquences peptidiques de différents opérons bactériens de résistance aux métaux lourds [6-8]. En plus de la conservation du motif GMTCSXC, l'alignement montre la conservation de nombreux autres acides aminés (résidus soulignés).

auparavant par très peu de laboratoires et fondé sur l'étude de la cinétique d'accumulation du $^{64}\text{Cu}^{2+}$ dans les fibroblastes en culture, et ouvrir de nouvelles perspectives pour l'étude de l'homéostasie cellulaire des métaux lourds essentiels ■

Jamel Chelly

Institute of Molecular Medicine, Human Genetics Laboratory, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, Royaume-Uni.

RÉFÉRENCES

1. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, Sung JH. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair and focal cerebral and cellular degeneration. *Pediatrics* 1962 ; 29 : 764-79.
2. Danks DM, Stevens BJ, Campbell PE, et al. Menkes' kinky-hair syndrome. *Lancet* 1972 ; 1 : 110.
3. Horn N, Tonnesen T, Tümer Z. Menkes disease : an X-linked neurological disorder of the copper metabolism. *Brain Pathol* 1992 ; 2 : 1-10.
4. Herd SM, Camakaris J, Christofferson R, Wookey P, Danks DM. Uptake and efflux of copper-64 in Menkes' disease and normal continuous lymphoid cell lines. *Biochem J* 1987 ; 247 : 341-7.
5. Tümer Z, Chelly J, Tommerup N, Ishikawa-Brush Y, Tønnesen T, Monaco AP, Horn N. Characterization of a 1.0 Mb contig spanning two chromosome breakpoints related to the Menkes disease. *Hum Mol Genet* 1992 ; 1 : 483-9.
6. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet* 1993 ; 3 : 7-13.
7. Chelly J, Tümer Z, Tønnesen T, Pettersson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nature Genet* 1993 ; 3 : 14-9.
8. Mercer LFB, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhavs M, Sicieniak D, Glover TW. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nature Genet* 1993 ; 3 : 20-5.
9. Peltonen L, Kuivaniemi H, Palotie A, Horn N, Kaitila I, Kivirikko I. Alterations in copper and collagen metabolism in the Menkes syndrome and a new subtype of the Ehler-Danlos syndrome. *Biochemistry* 1983 ; 22 : 6156-63.
10. Levinson B, Gitschier J, Vulpe C, Whitney S, Yang S, Packman S. Are X-linked *cutis laxa* and Menkes disease allelic? *Nature Genet* 1993 ; 3 : 6.

Une journée Recherche dans le cadre d'EUROCANCER 93 se tiendra à Paris le 27 avril 1993, sous la présidence de P. Tambourin et M. Boiron, sur le thème « De la recherche oncologique à l'innovation thérapeutique » avec, entre autres, le patronage de l'INSERM.

Programme

- Introduction et présentation de la journée (P. Tambourin, Paris) ;
- Génétique des antigènes de rejet tumoral : nouvelles perspectives pour l'immunothérapie spécifique (Th. Boon, Bruxelles) ;
- Contrôle de l'expression génétique (M. Yaniv, Paris) ;
- Oncogènes mutants : cibles pour la thérapie (N. Lemoine, Londres) ;
- Le couple prolifération-différenciation (L. Degos et H. de Thé, Paris) ;
- Nouvelles cibles et nouveaux concepts en chimiothérapie anti-cancéreuse (N.W. Lobbezoo, Amsterdam) ;
- Chimio-prévention des cancers (A. Costa, Milan) ;
- Modulation de la résistance multidrogue associée à la P-glycoprotéine des cellules tumorales (G. Atassi, Paris) ;
- Chimio- et radioprotecteurs (M. Marty, Paris) ;
- Transfert de gènes (Th. Velu, Bruxelles et T. Blankenstein, Berlin) ;
- Anticorps monoclonaux humains (J. Banchereau, Lyon) ;
- Conclusion (M. Boiron, Paris).

L'examen des posters et leur discussion auront lieu au moment de la pause-déjeuner.

3 posters seront sélectionnés pour présentation orale par le jury scientifique d'Eurocancer : P. Tambourin (Président), F. Calvo, H. Fridman (INSERM U.255), S. Gisselbrecht, C.-J. Larsen (INSERM U.301), A. Tavitian (INSERM U.301), A. Tavitian (INSERM U.248), Th. Tursz.

Le prix du meilleur poster sera remis en fin de journée par P. Tambourin et le comité scientifique.

Les actes de cette journée seront disponibles sur forme d'une co-édition INSERM/John Libbey Eurotext dans la collection des Colloques de l'INSERM. Pour renseignement complémentaire et inscription, s'adresser au secrétariat scientifique : M. Boiron, M. Marty, M.-C. Guédès, Centre Hayem, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Vellefaux, 75010 Paris. Tél. : 42.06.32.60 ou 42.03.36.56 • Télécopie : 42.41.14.70.

Un symposium international sur le thème « Ochratoxicose humaine et pathologies associées en Afrique et dans les pays en voie de développement » se tiendra à Bordeaux du 3 au 7 juillet 1993 avec le soutien de l'INSERM, de l'UNEP (United Nation Environment Program) et de la Région Aquitaine.

Il réunira les principaux spécialistes internationaux de l'ochratoxine A (mycotoxine, contaminant alimentaire) (G. Dirheimer, H. Bartsch, M. Castegnaro, T. Kuiper-Goodman, P. Galtier, P. Bach, R. Plestina, B. Hald, P. Steyn, Y. Ueno, etc.) et des équipes de chercheurs ayant mis en évidence des maladies liées à l'ochratoxicose humaine et animale dans leurs pays respectifs (Afrique, Asie). Les objectifs principaux sont les suivants :

- savoir si la néphropathie endémique des Balkans, vraisemblablement due à l'ochratoxine A, existe en dehors de cette aire géographique ;
- quelles sont les pathologies associées à l'ochratoxicose dans les pays en voie de développement, en comparaison avec ce qui est observé dans les Balkans ;
- comment expliquer la spécificité rénale de cette mycotoxine (néphrotoxicité et tumeurs) ;
- quels sont les moyens de prévention et/ou de traitement de l'ochratoxicose (25 à 60 % au moins des personnes sont OTA-positives en Europe) ;
- comment mettre en place un réseau Nord-Sud de collaboration sur ce sujet qui concerne aussi bien les pays industrialisés que les pays sous-développés.

Les actes paraîtront pour le symposium, sous forme d'une co-édition INSERM/John Libbey Eurotext dans la collection des Colloques de l'INSERM.

Pour tout renseignement et inscription, s'adresser avant le 28 février 1993 au Pr. E. E. Creppy, Laboratoire de Toxicologie, Université de Bordeaux II, 33076 Bordeaux cedex, « Tél. : 56.91.84.07 » Télécopie : 56.91.14.16.