m/s SYNTHÈSE
médecine/sciences 1989 ; 5 : 450-458

Retard mental lié à la fragilité du chromosome X : où en est-on en 1989 ?

Le retard mental associé à une fragilité du chromosome X, est une maladie fréquente (un garçon sur 1 500 environ) et grave. Sa transmission est liée au sexe, mais la pénétrance est variable, certains hommes transmetteurs et possédant un chromosome X fragile étant asymptomatiques. Malgré le nombre et la qualité des équipes étudiant les mécanismes de cette affection, malgré aussi la diversité et la puissance des techniques de génétique moléculaire mises en œuvre, la nature et la séquence des régions d'ADN impliquées dans l'anomalie cytogénétique et dans le syndrome clinique restent inconnues.

Bertrand R. Jordan
Jean-François Mattei

ADRESSES

B.R. Jordan : *directeur de recherche au Cnrs.* Équipe de génétique moléculaire humaine, centre d'immunologie Inserm-Cnrs, Campus de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France.
J.-F. Mattei : *professeur à la faculté de médecine de Marseille.* Inserm U. 242 et centre de génétique médicale, hôpital d'enfants de la Timone, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Il y a, en fait, très longtemps que Penrose (1938) [1] avait remarqué l'excès de garçons parmi les retardés mentaux et avait évoqué l'hypothèse d'un retard mental lié au sexe. Cette hypothèse fut reprise seulement en 1972 par Lehrke [2]. A la même époque, en Australie, des travaux étaient menés par Turner et Turner [3] qui observaient que les garçons retardés mentaux avaient beaucoup plus souvent des frères eux-mêmes retardés mentaux que les filles atteintes n'avaient de sœurs retardées mentales. En l'absence de cause précise s'est ainsi développée la notion de retard mental non spécifique lié au chromosome X, confortée par tout un ensemble d'observations rapportées dans la littérature revue par Mattei *et al.*, 1984 [4]. En 1980, l'enquête rétrospective de Herbst et Miller en Colombie britannique [5] confirmait l'existence de ce retard mental et évaluait la fréquence des garçons atteints à 1,83 pour 1 000. Simultanément la description de syndromes cliniques précis permettait d'entreprendre le démantèlement nosologique de cet ensemble hétérogène.

Il était donc trop tôt, lorsque Lubs rapporta en 1969 [6] l'observation d'une famille avec plusieurs sujets retardés mentaux, tous du sexe masculin et tous porteurs d'un chromosome X « marqueur » caractérisé par un pseudo-satellite à l'extrémité des bras longs, pour que l'importance de cette donnée soit appréciée à sa juste valeur. Elle fut redécouverte quelques années plus tard ; on s'aperçut alors que ce chromosome X marqueur était associé au retard mental avec macroorchidie*, ce qui permettait d'isoler un syndrome nouveau [3, 7, 8].

Bien que nos connaissances aient, depuis, considérablement progressé,

* *Taille augmentée des testicules.*

il faut admettre que les travaux réalisés conduisent à poser beaucoup plus de questions qu'ils n'apportent de réponses. Le « Retard mental lié à la fragilité du chromosome X » demeure donc aujourd'hui encore un syndrome mystérieux. Il constitue pourtant — dans les domaines de la pédiatrie, de la génétique, de la biologie et de la santé publique — un problème important devenu même préoccupation prioritaire dans certains pays [9], pas toujours en France malheureusement. C'est parce que les données classiques de la clinique, de la cytogénétique, de la génétique et de l'épidémiologie n'ont pas apporté de solution satisfaisante que les nouvelles approches par les techniques de la génétique moléculaire ont été rapidement entreprises « à la recherche du gène » dès 1983 [10].

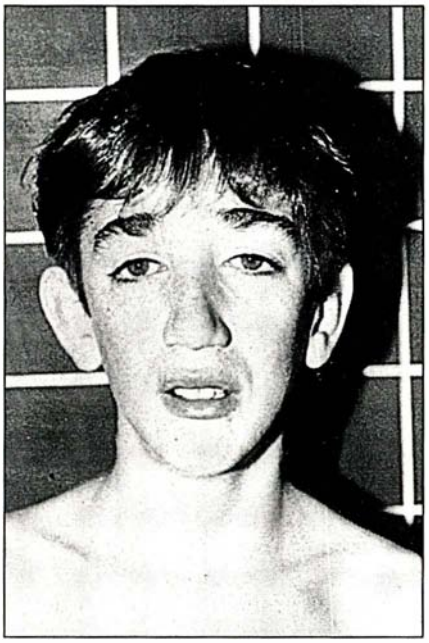

Figure 1. ***Un garçon présentant l'aspect typique du syndrome de retard mental lié à la fragilité du chromosome X (visage allongé, lèvres épaisses, grandes oreilles).***

Les données classiques

Cliniquement, la forme typique associe un retard mental, une dysmorphie faciale et une macroorchidie [11].

Le retard mental est très variable, de l'intelligence subnormale à la débilité profonde. Cette variabilité existe d'une famille à l'autre, mais aussi au sein d'une même famille. Ce retard mental est caractérisé par des troubles du langage et devient manifeste après la deuxième année. Il s'y associe souvent des troubles du comportement avec instabilité et agressivité. Parfois même le diagnostic d'autisme est évoqué. Le syndrome dysmorphique comporte un faciès particulier avec visage allongé, front haut, machoire proéminente avec menton saillant, lèvres épaisses, incisives médianes supérieures de grande taille. Les oreilles sont grandes et mal ourlées. L'ensemble est alors suffisamment caractéristique pour faire évoquer le diagnostic (*figure 1*). Bien que la macroorchidie ait été signalée parfois dès le jeune âge, elle apparaît généralement après la puberté. Elle est importante mais nécessite une évaluation précise et rigoureuse.

Si cette triade particulièrement originale est observée dans la majorité des cas, il faut cependant souligner que les pièges sont nombreux : la dysmorphie peut être discrète, dissociée, voire absente ; on a signalé des hommes avec fragilité du chromosome X dont l'intelligence était normale ; enfin la macroorchidie est absente dans 20 % des cas. C'est dire que les critères cliniques ne sont pas formels et ne permettent pas d'organiser efficacement le dépistage de l'affection.

Sur le plan chromosomique, les choses ne sont malheureusement pas beaucoup plus claires. Le site fragile (*figure 2*) situé dans la région Xq27-28 a des aspects variables selon les mitoses (cassures, lacunes, étirements...), ne s'observe que dans un pourcentage limité de cellules et, surtout, sa mise en évidence dépend étroitement des techniques utilisées. C'est à Sutherland que revient le mérite d'avoir défini en 1977 le rôle capital joué par la carence en acide folique dans les milieux de cultures cellulaires pour le diagnostic du site fragile [12]. D'autres facteurs interviennent, difficiles à expliquer et à maîtriser, tels que la durée de la culture, le délai à l'ensemencement, la teneur en thymidine. On peut remarquer que les différents modes d'induction du site fragile interfèrent avec la synthèse des déoxynucléotides et qu'il s'agit donc peut-être d'une zone chromosomique dans laquelle la réplication de l'ADN est particulièrement difficile. En tout cas, il est clair qu'il faut, pour le diagnostic cytogénétique, avoir recours à des techniques spécifiques mises en œuvre dans des laboratoires expérimentés et utilisant des antagonistes de l'acide folique tels que le méthotrexate ou la fluorodéoxyuridine qui augmentent le pourcentage des sites fragiles. Cela est d'autant plus vrai

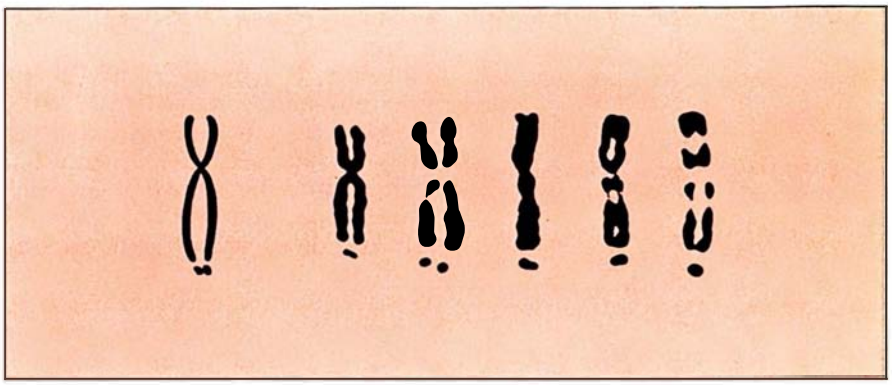

Figure 2. ***Aspect du chromosome X fragile.*** *A gauche schéma, à droite cinq chromosomes montrant le site fragile sur les deux chromatides sœurs (cliché, Marie-Geneviève Mattéi).*

qu'il est encore plus aléatoire de mettre en évidence le site fragile dans des cellules telles que les fibroblastes cutanés et les amniocytes [13]. La mise au point de méthodes appropriées permet, dans les meilleures conditions, de faire le diagnostic prénatal avec une bonne probabilité qui n'exclut cependant pas la possibilité de faux négatifs et le recours parfois indispensable au prélèvement de sang fœtal. Il faut donc souligner que trop d'inconnues persistent encore dans la maîtrise des techniques, que trop peu de laboratoires ont acquis l'expérience de telles investigations et que certaines observations demeurent inexpliquées comme la fréquente impossibilité d'identifier le site fragile chez les femmes conductrices obligatoires ayant atteint l'âge adulte [8]. Les techniques cytogénétiques, pour déterminantes qu'elles soient, ne sont donc pas l'argument absolu.

L'étude génétique des premières familles avait permis de croire que l'affection se transmettait selon le mode récessif lié au chromosome X, les femmes étant conductrices et la moitié de leurs garçons atteints, comme pour l'hémophilie ou la myopathie de Duchenne par exemple (*figure 3*). En fait, les choses sont probablement beaucoup plus compliquées. Des observations ultérieures et les travaux de Sherman *et al.*, notamment [14], ont permis de démontrer que 30 % des femmes conductrices avaient en fait des signes cliniques plus ou moins évidents, que chez environ 50 % des conductrices obligatoires on ne pouvait mettre en évidence le site fragile, et enfin que 20 % au moins des hommes porteurs du site fragile étaient apparemment sains et indemnes de tous signes de l'affection néanmoins transmise à leurs petits-fils par l'intermédiaire de leurs filles conductrices... La fréquence des signes cliniques chez les femmes conductrices, non ou mal expliquée par une inactivation préférentielle d'un des deux chromosomes X, l'existence démontrée de mâles transmetteurs sains, généralement grands-pères mais aussi parfois frères de garçons atteints, conduisent à repenser totalement le mode de transmission de l'affection [18]. On a successivement proposé l'hypothèse d'une prémutation [15], d'un suppresseur autosomique [16], ou de la persistance d'une zone restant inactivée sur un chromosome X fragile après le processus de réactivation de la méiose féminine [17]. Aucune de ces hypothèses n'est totalement satisfaisante et on se contente aujourd'hui de dire qu'il s'agirait plutôt d'une transmission dominante liée au chromosome X avec pénétrance incomplète et expressivité variable, ce qui ne veut pas dire grand-chose et ne cache même pas notre totale ignorance quant au déterminisme génétique de la maladie. Cela est d'autant plus vrai qu'on peut même s'interroger sur le lien existant entre le site fragile et l'affection, puisque nous avons récemment observé dans une famille de nombreux sujets des deux sexes porteurs de site fragile sans aucun signe clinique associé [18]. Cette observation reste exceptionnelle mais donne néanmoins à réfléchir.

Les données épidémiologiques, malgré toutes ces difficultés, confirment la fréquence de l'affection et l'importance qu'elle prend dans l'étiologie du retard mental. Toutes les enquêtes réalisées, que ce soit en Australie, aux États-Unis ou en Europe, permettent d'estimer la fréquence à un garçon sur 1 500, ce qui en fait donc la deuxième cause de retard mental chez le garçon avec la trisomie 21 [19]. De plus, contrairement à la trisomie 21, qui est en général non récurrente dans les familles, le mode de transmission du syndrome de l'X fragile a pour résultat que les familles présentent souvent plusieurs enfants atteints. Compte tenu de cette fréquence, mais aussi des implications génétiques dans les familles, du conseil génétique qui repose sur le dépistage des conductrices mais aussi des transmetteurs sains, du possible diagnostic prénatal, qui impose une technique rigoureuse, on comprend que les recherches se soient rapidement dirigées dans le domaine de la biologie moléculaire.

Un espoir, l'étude au niveau de l'ADN

Les sondes moléculaires ont donné l'espoir d'un diagnostic prénatal fia-

RÉFÉRENCES

1. Penrose LS. A clinical and genetic study of 1 280 cases of mental defect. *Special Report Series n° 229*. London : Medical Research Council, 1938.

2. Lehrke R. A theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 1972 ; 76 : 611-9.

3. Turner G, Turner B. X-linked mental retardation. *J Med Genet* 1974 ; 11 : 109-13.

4. Mattei JF, Mattei MG, Auger M, Giraud F. Le retard mental lié à la fragilité du chromosome X : connaissances actuelles. *J Genet Hum* 1984 ; 3 : 167-92.

5. Herbst DS, Miller JR. Non-specific X-linked mental retardation. II : The frequency in British Columbia. *Am J Med Genet* 1980 ; 7 : 461-70.

6. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* 1969 ; 21, 231.

7. Giraud F, Aymé S, Mattei JF, Mattei MG. Constitutional chromosomal breakage. *Hum Genet* 1976 ; 34 : 125-36.

8. Sutherland GR. Marker X chromosomes and mental retadation. *N Engl J Med* 1977 ; 296 : 1415.

9. Turner G, Robinson H, Laing S. Preventive screening for the fragile X syndrome. *N Engl J Med* 1986 ; 315 : 607-9.

10. Camerino G, Mattei MG, Mattei JF, Jaye M, Mandel JL. Close linkage of fragile X-mental retardation syndrome to hemophilia B and transmission through a normal male. *Nature* 1983 ; 306 : 701-4.

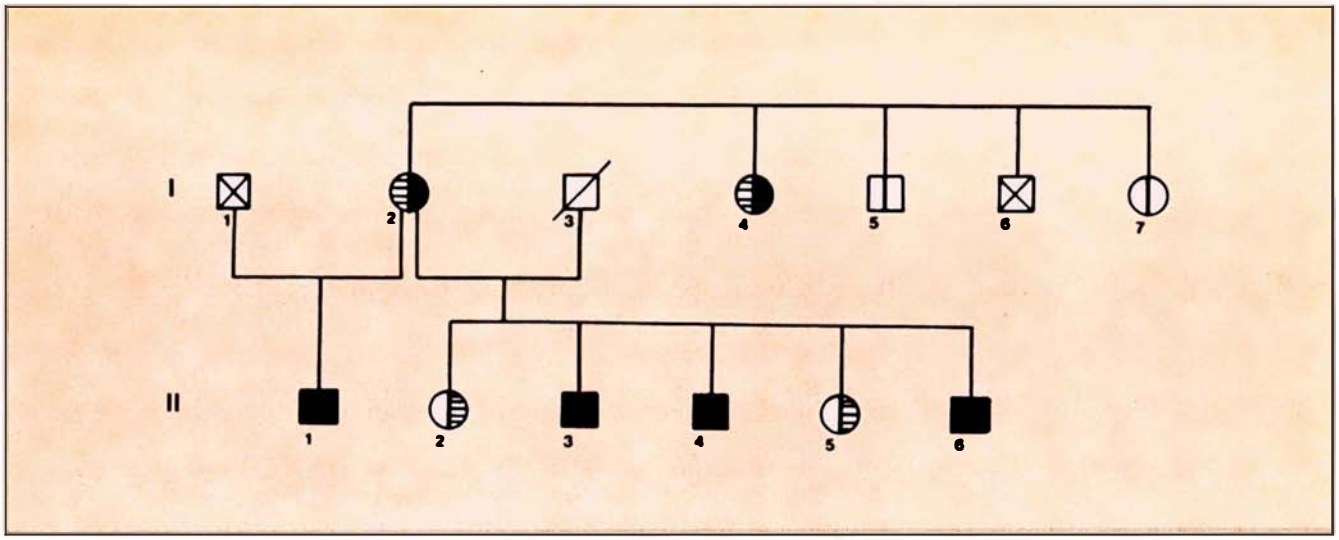

Figure 3. ***Arbre généalogique d'une famille présentant le syndrome de retard mental lié à la fragilité du chromosome X.*** *Le retard mental est figuré sur la partie droite des symboles ainsi le garçon II-1 présente à la fois retard sévère et X fragile très net, alors que la fille II-2 n'a pas de retard mental décelable mais un X fragile peu marqué (noir : retard sévère ; hachuré : retard léger) ; la présence de l'X fragile est notée selon le même code sur la partie droite des symboles. La femme I-2, qui présente un retard mental léger et un X fragile affirmé, a eu des garçons retardés mentaux de deux pères différents, ce qui démontre bien son caractère de conductrice. Symbole barré : décès. Symbole croisé : non étudié.*

ble. On a isolé en effet, depuis quelque temps, des sondes situées de part et d'autre du site fragile — soit en Xq27 comme le gène du facteur de coagulation IX, soit en Xq28 comme le gène du facteur de coagulation VIII — ou encore des sondes « anonymes » (c'est-à-dire dont on ne sait pas si elles correspondent à un gène) comme la sonde ST14, qui correspond à un *locus* très polymorphique, donc très informatif, le *locus* DXS52. Et de fait, une des premières familles étudiées a montré une très forte liaison entre les polymorphismes révélés par ces sondes et le syndrome en question. Cependant des résultats contradictoires ont été obtenus par la suite, indiquant dans ces cas de fréquentes recombinaisons entre, par exemple, le gène du facteur IX (F9) et le site fragile (Fra X), ce qui est le signe d'une faible liaison génétique.

Il s'avère, en fait, d'après les derniers résultats, que la fréquence de recombinaison dans cette région (autour du site fragile) est variable, très élevée dans certaines familles et quasiment nulle dans d'autres [27]. Cela veut donc dire soit que la distance physique F9-FraX varie d'une famille à une autre, soit qu'un élément de cette région est plus ou moins recombinogène selon les cas. Phénomène fascinant certes, mais bien ennuyeux dans la pratique puisque, du coup, l'incertitude sur la validité d'un diagnostic prénatal effectué à l'aide de ces sondes est très grande. Il semble donc vital d'obtenir des sondes plus proches du site fragile, donc plus fiables, et surtout d'identifier le gène présent dans cette région et qui est impliqué dans ce syndrome.

La course au gène : un cas « classique » de génétique inverse ? A la lecture de la description clinique, la situation semble être un cas typique de « génétique inverse » : nous sommes en présence d'un syndrome héréditaire lié au chromosome X et plus particulièrement à la région Xq27.3, étant donné la localisation du site fragile et l'association quasi constante (malgré quelques exceptions) entre ce site fragile et le syndrome. Quelles que soient les complexités clinique et génétique discutées ci-dessus, la raison de ce syndrome doit être en dernière analyse une modification d'un gène ou, en tout cas, d'une zone d'ADN quelque part dans la région Xq27.3. Mais en l'absence de toute autre information, comme la connaissance d'un défaut biochimique ou un indice sur le tissu dans lequel doit normalement s'exprimer ce gène, on se trouve plus démuni, par exemple, que dans le cas de la myopathie de Duchenne. Cela d'autant plus qu'on ne connaît, pour le moment, ni translocation ni délétion causant la maladie et susceptible d'être exploitée comme dans d'autres cas [20]. Pour obtenir des sondes très proches du gène impliqué, il ne reste donc qu'à explorer la région en question pour repérer les gènes qui s'y trouvent et les examiner l'un après l'autre un peu comme cela est fait actuellement pour la mucoviscidose dans la région q22 du chromosome 7 [21].

La zone à étudier présente d'ailleurs pour le biologiste moléculaire un triple intérêt, puisqu'elle contient à la fois un site fragile (on n'a, à l'heure actuelle, cloné aucun site fragile et on est donc dans l'ignorance complète du type de séquence au niveau de l'ADN qui a pour conséquence ce phénotype cytogénétique), une importante hétérogénéité de recombinaison et enfin, bien sûr, un ou plusieurs gènes responsables, lorsqu'ils sont défectueux, de ce syndrome de retard mental. Mais cette région est difficile d'accès, comme en témoigne le fait que, malgré l'intérêt du sujet et les efforts déployés depuis plusieurs

années par de nombreux laboratoires, on n'a toujours ni atteint le site fragile, ni élucidé l'hétérogénéité de recombinaison, ni, bien sûr, isolé le gène impliqué dans ce retard mental.

A la « pêche aux sondes ». C'est un terme un peu imagé, mais qui reflète bien la réalité de la démarche : il s'agit de prendre au hasard dans une banque génomique des clones d'ADN, puis de déterminer leur localisation (leur origine) par hybridation *in situ* ou utilisation d'un jeu d'hybrides somatiques, en espérant que certains d'entre eux proviendront de la région du site fragile et pourront donc servir de point de départ pour son exploration. Pour accroître l'efficacité de la « pêche », on part d'une banque limitée, construite à partir de chromosomes X préalablement triés, ou à partir d'une cellule hybride hamster-homme ne contenant qu'une partie du chromosome X humain (il est relativement facile de distinguer les clones d'ADN humain et ceux de hamster). Plus la banque de départ est restreinte, plus la probabilité de trouver des clones intéressants est grande, mais les banques les plus « pointues » contiennent encore au moins 10 à 20 % du chromosome X (les bandes q27 et q28, par exemple). Dans ces conditions, si le site fragile correspond à une petite partie de l'extrémité distale de la bande q27, la proportion de clones intéressants restera faible.

Cette « pêche aux sondes » a été mise en pratique par plusieurs groupes en France et à l'étranger. Elle représente un travail considérable car l'étape cruciale, la localisation d'un clone pour savoir s'il provient ou non de la zone voulue, se fait de façon individuelle : préparation de l'ADN de ce clone, marquage, hybridation à un *Southern blot* comportant l'ADN d'une série de cellules témoins (hybrides homme-hamster ou homme-souris) permettant de déterminer l'origine de ce clone. Si l'on imagine que la zone du site fragile s'étend sur 100 kilobases d'ADN, et que l'on est parti d'une banque ne contenant que des clones provenant de Xq27 et Xq28, région qui couvre environ 10 000 kilobases (kb), on peut voir qu'il faudra essayer ainsi des dizaines et peut-être des centaines de clones pour espérer en trouver un dans la bonne région, à supposer que l'on ait des moyens efficaces pour déterminer, justement, si le clone est dans cette région... (voir plus loin pour la discussion de ce point).

Les sondes obtenues présenteront de plus un intérêt très différent selon qu'elles révèlent ou non dans l'ADN des fragments polymorphiques (RFLP). Dans le premier cas, elles seront utiles pour des études familiales et éventuellement pour le diagnostic prénatal, puisqu'elles permettront de suivre la transmission de la zone du chromosome X considéré ; et, du fait de leur polymorphisme, leur position par rapport à d'autres sondes déjà connues pourra être précisée par l'étude (génétique) des familles. Si, en revanche, et c'est le cas en moyenne neuf fois sur dix, ces sondes ne révèlent pas de RFLP, leur utilité immédiate sera limitée et leur position exacte difficile à préciser.

Même en tenant compte de tous ces problèmes, le résultat du travail considérable effectué par plusieurs excellents groupes en France et à l'étranger reste très décevant. Comme l'indique la *figure 4*, les gènes des facteurs de coagulation VIII et IX (F8 et F9), situés de part et d'autre du site fragile et dont la position est connue depuis plusieurs années, restent quasiment les sondes les plus proches du site fragile. Seules deux ou trois sondes nouvelles ont pu être ajoutées entre F9 et le site fragile, mais les seules dont la position soit connue avec un peu de précision, les sondes cX 55.7 et 4D8 (révélant les loci DXS 105 et DXS 98) sont encore très loin de ce site : de 4 (22) à 16 (23) centimorgans, soit en principe autant de milliers de kilobases puisque en moyenne, un centimorgan correspond à 1 000 kilobases.

La pauvreté en sondes de la région du site fragile contraste avec la relative abondance constatée en position plus centromérique (q27, à gauche sur la *figure 4*) ou surtout plus télomérique (q28, à droite sur la *figure 4*). D'où quelques interrogations pour essayer de comprendre cette répartition apparemment aberrante : les séquences contenues dans cette région seraient-elles « inclonables » et donc absentes des banques utilisées ? Ou comprennent-elles essentiellement des séquences répé-

RÉFÉRENCES

11. Mattei JF, Mattei MG, Aumeras C, Auger M, Giraud F. X-linked mental retardation with the fragile X ; a study of 15 families. *Hum Genet* 1981 ; 59 : 281-9.

12. Sutherland GR. Fragile sites on human chromosomes : demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 1977 ; 197 : 265-6.

13. Mattei MG, Mattei JF, Vidal I, Giraud F. Expression in lymphocyte and fibroblast culture of the fragile X chromosome : a new technical approach. *Hum Genet* 1981 ; 59 : 166-9.

14. Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE. Further segregation analysis on the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985 ; 69 : 289-99.

15. Pembrey ME, Winter RM, Davies KE. A premutation that generates a defect at crossing-over explains the inheritance of fragile X mental retardation. *Am J Med Genet* 1985 ; 21 : 709-17.

16. Israel MH. Autosomal suppressor gene for fragile X : an hypothesis. *Am J Med Genet* 1987 ; 26 : 19-31.

17. Laird CD. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics* 1987 ; 117 : 587-99.

18. Voelckel MA, Philip N, Piquet C, *et al.* Study of family with fragile site of the X chromosome at Xq27-28 without mental retardation. *Hum Genet* 1989 ; 81 : 353-7.

19. Froster-Iskenius U, Felsch G. Screening for fra(X) (q) in a population of mentally retarded mals. *Hum Genet* 1983 ; 63 : 153-7.

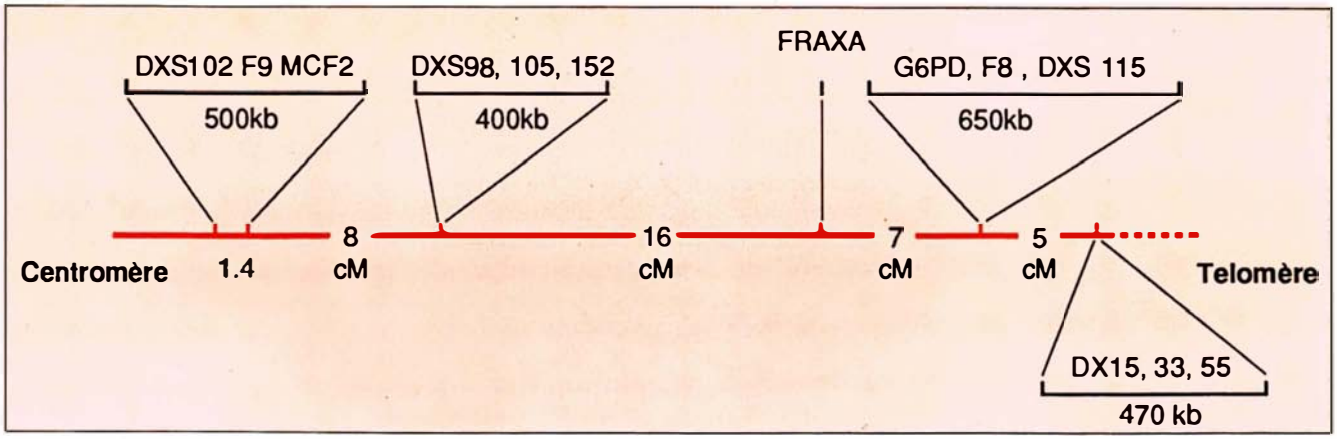

Figure 4. ***Carte génétique (au centre) des régions Xq27 et Xq28 au voisinage du site fragile.*** *Les distances sont indiquées en centimorgans ; l'hétérogénéité de recombinaison selon les familles (voir texte) semble se situer entre DXS 105 et Fra X : la distance indiquée ici est de 16 cM, mais dans certaines études elle n'est que de 4 cM. Pour les sondes qui ont été liées physiquement (par étude en champs pulsés), les positions et la taille maximale du segment en kilobases sont indiquées au-dessus ou au-dessous de la ligne centrale. DXS 102, 98, 105, 152, 115, 15, 33 et 52 sont des sondes « anonymes » détectant des polymorphismes ; F9 et F8 désignent les gènes des facteurs de coagulation IX et VIII respectivement ; MCF2 est un locus contenant une séquence transformante et G6PD le gène de la glucose 6 phosphate déshydrogénase. FRAXA désigne le site fragile en Xq27.3 dans la nomenclature internationale. Les positions relatives de certains loci (en particulier DXS 52 et F8 en Xq28) restent controversées.*

tées, présentes aussi à de nombreux autres endroits du génome, ce qui fait qu'on ne peut pas déterminer leur origine ? Ou encore, cette vaste zone d'environ 20 centimorgans qui va de DXS 105 à F8 (*figure 4*) pourrait-elle, en fait, correspondre à une petite longueur d'ADN très « recombinogène », donc donnant une grande distance génétique, mais peu étendue en fait et donc peu représentée dans les banques ?

Le mystère reste entier. Peut-être faut-il poursuivre obstinément ce type d'approche, en utilisant des banques de départ toujours plus pointues, construites à partir d'hybrides provenant de transfert de fragments de chromosomes (CMGT, *chromosome mediated gene transfer*) ou à l'aide de méthodes de microdissection « 2e génération », et en mettant en œuvre des techniques susceptibles de permettre l'analyse de centaines de clones grâce à une simplification et une robotisation de certaines étapes. Peut-être faut-il, au contraire, repenser entièrement la question...

Les approches ciblées : droit au but !

Au lieu de pêcher au hasard, on peut essayer d'atteindre directement la cible en « devinant » ce qu'est le site fragile ou ce que sont certaines de ses propriétés. Le risque est évidemment d'avoir deviné faux, mais on peut estimer que le jeu en vaut la chandelle. Par exemple, et comme sans doute d'autres laboratoires, nous avons imaginé que le site fragile pourrait être une structure du type « minisatellite » de Jeffreys (les séquences hypervariables par variation du nombre de motifs internes répétés qui sont utilisées en criminologie) car certaines des propriétés de ces séquences le suggéraient. Le criblage d'une banque du chromosome X par ces séquences n'a pas permis l'isolement de clones provenant de la région q27-q28. Même jeu pour le moment avec les séquences télomériques : si l'on pense (comme beaucoup de cytogénéticiens) que les sites fragiles sont les « cicatrices » de réarrangements chromosomiques intervenus au cours de l'évolution des espèces, il peut y rester des séquences télomériques. Là aussi le criblage de librairies du chromosome X par des séquences télomériques humaines (maintenant connues) n'a pas donné les résultats espérés. Expériences négatives, et comme telles non publiées et d'ailleurs n'excluant pas rigoureusement l'hypothèse, car l'échec peut être dû à des raisons techniques : il s'en est sans doute pratiqué beaucoup d'autres dans beaucoup d'équipes, mais on n'en trouve évidemment, et peut-être malheureusement, pas de trace dans la littérature.

Une tentative particulièrement intéressante, et qui a été publiée au moins en partie [24], est celle développée par S. Warren à Atlanta (USA). Son hypothèse est que les sites fragiles sont des points préférentiels de translocation entre chromosomes : si l'on favorise les translocations entre un chromosome X fragile et des chromosomes de hamster, celles-ci devraient se produire de façon préférentielle au site fragile et aboutir à un X portant à partir de l'emplacement du site fragile un morceau de chromosome de hamster (*figure 5*). Si tel est le cas, il devrait être alors relativement facile de construire, à partir de l'hybride contenant ce chromosome transloqué, une banque dans laquelle un clone, contenant à la fois de l'ADN humain et de l'ADN de hamster, contiendrait *ipso facto* un élément

du site fragile. Le repérage d'un tel clone est *a priori* facile : il doit hybrider à la fois, par le biais des séquences répétées, avec de l'ADN humain total et de l'ADN total de hamster.

S. Warren a bien obtenu [24] un chromosome transloqué X humain/hamster dans lequel la translocation semble avoir eu lieu au niveau du site fragile : il est positif avec toutes les sondes de Xq27 y compris cX55.7 (DXS 105, *figure 4*) et négatif avec celles de Xq28 ; d'autre part, le chromosome transloqué exprime encore le site fragile à la jonction homme-hamster, mais à une fréquence inférieure à celle de la cellule humaine d'origine, comme si une partie seulement du site fragile (envisagé comme une assez longue séquence d'une nature particulière) subsistait sur le chromosome transloqué (*figure 5*). Ces résultats sont si convaincants que, lorsqu'ils furent publiés en juillet 1987 (ils dataient donc au moins du début de l'année), beaucoup s'attendaient à ce que le clonage effectif du site fragile soit annoncé très rapidement, par exemple au *Human Gene Mapping* (n° 9, septembre 1987). Il n'en a rien été alors, ni jusqu'à ce jour (juin 1989), ce qui laisse à penser que ces travaux ont buté sur des difficultés fondamentales du type de celles évoquées à la fin du chapitre précédent.

Une autre tentative, sur laquelle on dispose de moins d'informations, implique la protéine de surface S11, dont le gène avait été assigné depuis très longtemps à la région Xq27 par des expériences d'hybrides somatiques [25]. Certaines rumeurs faisaient état d'une expression réduite de S11 dans des lignées provenant de patients X fragiles... Le clonage par expression du gène codant pour cette protéine, entrepris dans un des meilleurs laboratoires pour ce type de travail, celui de F. Ruddle à Yale, USA, semble avoir abouti mais, à notre connaissance, n'est pas publié et la liaison avec l'X fragile semble s'être estompée avec le temps.

Au total, donc, les approches ciblées n'ont pas encore abouti bien que certaines d'entre elles, et en particulier celle de S. Warren, soient très séduisantes. Peut-être butent-elles sur le fait que le site fragile lui-même est inclonable (ou clonable mais invérifiable parce qu'il est constitué par des séquences répétées) et qu'il faut atteindre non pas « l'intérieur » du site fragile (si l'on pense, comme cela paraît vraisemblable, qu'il a une certaine étendue) mais l'une ou l'autre de ses limites, c'est-à-dire l'endroit où a lieu la transition entre l'ADN de séquence « normale » et la séquence particulière qui constitue, par hypothèse, la base moléculaire de ce site.

Cartographier et sauter : la très longue marche ? L'évolution des techniques nous a apporté, au cours des toutes dernières années, trois méthodes [26] qui réduisent l'écart entre les techniques « classiques » du génie génétique, qui travaillent à l'échelle de la dizaine de kilobases, et la cartographie cytogénétique ou génétique qui, elle, compte par l'équivalent de milliers ou dizaines de milliers de kilobases (kb). Au niveau analytique, les techniques d'électrophorèse en champ pulsé permettent maintenant de fractionner et de cartographier l'ADN (cartes de restriction) sur des centaines ou des milliers de kilobases ; la marche le long du chromosome (pour aller d'un point connu, cloné, à la région inconnue à laquelle on s'intéresse), lente et pénible car son « pas » élémentaire n'est en pratique que de 20 à 30 kb, est remplacée par le saut qui permet de franchir d'un bond une ou plusieurs centaines de kilobases. Enfin, au niveau du clonage, les systèmes de chromosomes artificiels dans la levure (YAC, *yeast artificial chromosome*) permettent la construction de banques dans lesquelles chaque clone contient un fragment d'ADN humain long de plusieurs centaines de kilobases.

Le plus facile est de cartographier, c'est-à-dire d'établir des cartes de restriction autour des points définis par les sondes déjà connues (*figure 4*), en espérant arriver à lier physiquement ces sondes, c'est-à-dire à montrer que deux d'entre elles reconnaissent le même fragment obtenu par action d'une enzyme donnée sur l'ADN génomique. On peut ainsi progressivement ajouter à la carte génétique qui définit les distances entre les *loci* en termes de fréquence de recombinaison une carte physique qui les mesure en valeur absolue (kb) et définit un certain nombre de points

RÉFÉRENCES

20. Ray PN, Belfall B, Duff C, *et al.* Cloning of the breakpoint of an X ; 21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1985 ; 318 : 672-5.

21. Kitzis A, Warren P, Kaplan JC. Génétique inverse et mucoviscidose. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 151-6.

22. Veenema H, Carpenter NJ, Bakker E, Hofker MH, Millington Ward A, Pearson PL. The fragile X syndrome in a large family. III. Investigations on linkage of flanking DNA markers with the fragile site Xq27. *J Med Genet* 1987 ; 24 : 413-21.

23. Arveiler B, Oberle I, Vincent A, Hofker MH, Pearson PL, Mandel JL. Genetic mapping of the Xq27-q28 region : new RFLP markers useful for diagnostic applications in fragile X and hemophilia B families. *Am J Hum Genet* 1988 ; 42 : 380-9.

24. Warren ST, Zhang F, Licameli GR, Peters JF. The fragile X site in somatic cell hybrids : an approach for molecular cloning of fragile sites. *Science* 1987 ; 237 : 420-3.

25. Kamarck ME, Mac Yko CA, Cunningham AC, Ruddle F. The gene coding the human S11 surface antigen maps between the loci for HPRT and G6PD on the X chromosome. *Exp Cell Research* 1983 ; 149 : 325-34.

26. Jordan BR. Megabase methods : a quantum jump in recombinant DNA techniques. *Bioessays* 1988 ; 8 : 140-5.

27. Brown WT, Gross A, Chan C, *et al.* Multilocus analysis of the fragile X syndrome. *Hum Genet* 1988 ; 78 : 201-5.

28. Nguyen C, Poustka AM, Djabali M, *et al.* Large-scale mapping and chromosome jumping in the q27 region of the human X chromosome. Genomics 1989 ; 5 : 298-303.

intermédiaires, sites de coupure pour différentes enzymes de restriction. Cette carte physique a son intérêt propre, mais on peut de plus espérer l'étendre vers le site fragile et ainsi mieux définir la nature de cette région. A l'extrême, par exemple, si l'on prouvait (hypothèse d'école...) la liaison physique entre DXS 105 et F8 sur un fragment de 1 800 kb, on saurait que le site fragile se trouve quelque part dans ces 1 800 kb, ce qui préciserait considérablement la situation.

Nous n'en sommes pas là, et les cartes établies par différents laboratoires ne représentent, à l'heure actuelle, que des îlots séparés par de grandes distances, au moins génétiques. On observe là aussi (*figure 4*) que des groupes compacts de *loci* se retrouvent en Xq27 et Xq28, plus compacts même que ne l'indiquaient les données génétiques, en ce sens que les distances physiques trouvées ne sont souvent qu'une fraction de celles attendues, mais que de F9 à F8 s'étend sur plus de dix ou vingt centimorgans un désert jalonné par seulement un groupe de sondes tout près de DXS 105. La poursuite de ce travail amènera sans doute des surprises à plusieurs niveaux. Les critères de qualité d'une cartographie en champ pulsé ne sont pas encore bien établis, et il ne serait pas étonnant que certaines liaisons publiées se révèlent erronées tandis que de nouvelles apparaissent. Certains ordres ou distances génétiques, reposant sur une seule recombinaison dans une famille, pourraient aussi être remis en question. Le rapport entre distance physique et distance génétique paraît anormal alors que la région où se situe l'hétérogénéité de recombinaison (DXS 105-FraX) n'a pas encore été abordée par la cartographie (faute de sondes !). Enfin la progression d'un travail de cartographie de ce type est assez imprévisible et les pièces du puzzle peuvent être mises en place très rapidement ou au contraire rester longtemps méconnues.

La carte fournit en tout cas une base de départ pour l'utilisation de tactiques de **saut le long du chromosome**. Les banques de saut réunissent dans un même clone, par des artifices de construction, les deux extrémités d'un grand fragment d'ADN obtenu par digestion complète à l'aide d'une enzyme à site rare ou par digestion partielle à l'aide d'une enzyme à site fréquent. Elles permettent donc, si l'on a un clone correspondant à une extrémité, d'obtenir l'autre extrémité du même fragment, c'est-à-dire de sauter le long du chromosome d'une distance égale à la taille du fragment. Dans la pratique, l'utilisation de telles banques demande une bonne connaissance de la région à partir de laquelle on veut sauter afin d'utiliser le bon clone de départ et, point non trivial..., d'être sûr de sauter dans la bonne direction ! Nous avons récemment utilisé cette technique en collaboration avec A.M. Poutska pour faire un premier saut de 130 kb en direction du site fragile [28] et effectuons actuellement le deuxième saut qui devrait, lui, permettre de franchir 340 kb. Ces distances, bien que respectables pour un biologiste moléculaire, peuvent paraître ridicules face au chemin qui reste à parcourir : 16 centimorgans de DXS 105 au site fragile, soit théoriquement 16 000 kb. Mais il semble en fait peu vraisemblable que cette distance dépasse quelques milliers de kilobases pour les raisons développées plus haut. L'approche par le saut, même si elle est frustrante par sa lenteur, nous permet au moins d'avancer et, chemin faisant, d'étendre peu à peu la carte physique.

Reste évidemment une question délicate : à supposer que l'on atteigne le site fragile, comment s'en apercevra-t-on ? Il y a plusieurs réponses possibles, mais aucune n'est totalement satisfaisante. (1) La séquence du site fragile est peut-être si particulière qu'elle sera évidente, par exemple une longue séquence à répétitions internes, inclonable et non coupée par la plupart des enzymes de restriction à cause de sa séquence particulière. (2) L'approche du site fragile peut être appréciée, grossièrement, par hybridation *in situ* en par-

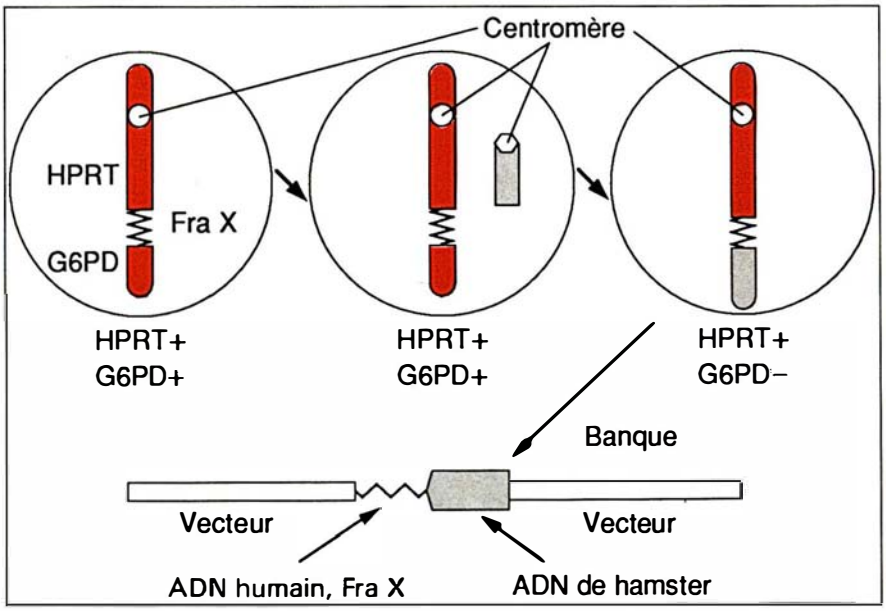

Figure 5. ***Schéma de principe des expériences de S. Warren [24] montrant les étapes cellulaires successives (seul le chromosome X et le partenaire hamster de translocation sont indiqués), avec (en bas) le clone espéré contenant à la fois de l'ADN humain et de l'ADN de hamster.*** *HPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase.*

ticulier sur des chromosomes présentant le site fragile et, peut-être plus finement, par l'analyse génétique de la liaison entre les polymorphismes révélés par les sondes nouvellement obtenues et le retard mental dans des familles informatives (présentant une recombinaison entre DXS 105 et le site fragile, par exemple). Ces sondes seraient, bien sûr, directement utilisables pour accroître la fiabilité du diagnostic prénatal.

Et après ?

Il ne faut pas oublier que le site fragile et le gène responsable (lorsqu'il est défectueux) du retard mental ne sont pas forcément confondus, même si leur association quasi systématique indique qu'ils doivent être très proches au niveau moléculaire. Une fois la région du site fragile identifiée et clonée, il restera encore à repérer les différents gènes contenus dans cette région, chez l'individu normal et chez le malade, et à rechercher lequel de ces gènes peut être différent, dans sa structure ou son expression, chez l'individu atteint du retard mental. Compte tenu de l'étendue probable de la région à examiner et de l'état d'ignorance complet dans lequel on se trouve en ce qui concerne les caractéristiques du gène recherché (dans quel tissu est-il censé s'exprimer, par exemple ?), cette identification sera difficile. Elle serait certainement facilitée si toute la région suspecte (quelques centaines de kilobases !) pouvait être clonée en un seul morceau dans le système YAC au lieu d'avoir à être assemblée à partir d'un grand nombre de petits segments clonés dans les phages ou les cosmides, avec tous les aléas que cela présente.

Enfin, une fois cette identification réalisée, il restera à voir quel est le produit normal du gène incriminé, où et comment il exerce sa fonction, à quel stade du développement ou à quel moment de la vie sa présence est nécessaire. On verra alors, comme c'est le cas actuellement pour la myopathie de Duchenne, un basculement complet de ce domaine de recherche dont le centre d'intérêt reviendra vers la biologie cellulaire, la physiologie et, pourquoi pas, la thérapie, ce qui, après tout, est le but de la recherche médicale ■

Summary

Fragile X-linked mental retardation, 1989

The fragile X-linked mental retardation syndrome associates severe mental retardation, a number of dysmorphic features and, on cytogenetic examination, a fragile site at Xq27.3. It is a frequent genetic disorder, recognized as such since more than twenty years, and still poorly understood. Its genetics are complex, quite different from a straightforward X-linked recessive situation ; diagnosis by cytogenetics or DNA analysis is not always reliable, and the nature of the gene(s) responsible, when defective, for this phenotype is completely unknown. Molecular biologists have devoted a lot of effort to « cloning the fragile site », i.e. obtaining DNA probes mapping to this particular region. Several kinds of « brute force » or « targeted » approaches have been applied, with somewhat disappointing results : peculiarities of this region such as a possible recombination anomaly, and the very nature of the DNA sequence responsible for the fragile site may be responsible for this. It is difficult to predict which approach will eventually lead to the goal, but it is likely that this will occur fairly soon and that the focus will then shift, as in other cases, to identification of the gene product and elucidation of its function.

TIRÉS A PART

B.R. Jordan.