

Identification du gène de la neurofibromatose de type 1 (NF1). Un nouveau mégagène

La neurofibromatose de type 1 de von Recklinhausen est une affection à transmission autosomique dominante, qui atteint une personne sur 3 000 à 4 000. Sa gravité est très variable, avec comme bases cliniques la présence de taches café au lait et de neurofibromes. Les mutations nouvelles y sont très fréquentes (environ 50 %). Un effort coordonné mettant en jeu toutes les techniques disponibles avait permis de localiser le gène en 17q11.2 (*m/s*, n° 5, vol. 5, p. 342), mais il restait une incertitude portant sur 3 000 kb. C'est la découverte chez deux malades de deux translocations, apparemment équilibrées, entre le chromosome 17, d'une part, et respectivement les chromosomes 1 et 22, d'autre part, entraînant une NF1 probablement par rupture du gène, qui a été à l'origine des progrès décisifs. Distantes seulement de 60 kb, elles délimitaient la zone où il fallait chercher. Trois gènes de petite taille, situés entre ces points de cassure, ont été successivement incriminés ; un gène dit *EV12*, homologue d'un oncogène murin mais sans fonction définie chez l'homme, un gène *RC1*, tous deux codant pour des protéines transmembranaires, et le gène codant pour la protéine OMGP (*oligodendrocyte myelin glycoprotein*), peptide de surface du système nerveux central. Aucun de ces gènes n'est impliqué dans une des translocations et n'est altéré dans la NF1. On semblait donc aboutir à une impasse. Deux équipes bien connues en génétique, toutes deux soutenues par le *Howard Hughes Institute*, entreprirent, d'abord en collaboration puis en concurrence de plus en plus sévère, l'identification du gène : celles de Francis Collins [1] (Ann Arbor, MI)

et de Ray White [2, 3] (Salt Lake City, UT), chacune forte d'une douzaine de chercheurs. Elles émirent l'hypothèse d'un gène de grande taille, dans lequel les gènes d'abord envisagés pourraient être « enfouis » ; en conséquence, elles s'adressèrent aux méthodes susceptibles d'explorer de longs segments d'ADN, telles que l'électrophorèse en champ pulsé, les bonds sur le chromosome, les insertions dans des chromosomes artificiels de levure (YAC : *yeast artificial chromosome*). Chaque équipe obtint des clones qui s'hybridaient avec un transcrite de grande taille, de 11 ou 13 kb. L'ensemble des clones séquencés par l'équipe de Collins s'étend sur 2 012 bases [1] ; celui obtenu par l'équipe de White sur 3 986 bases. C'est la partie 3' du gène qui a été explorée ; dans la zone où elles se chevauchent, les séquences décrites par les deux groupes sont les mêmes ; il reste toutefois une incertitude sur l'extrémité COOH de la portion codante : elle est due à un piège connu des « séquençologues » : une séquence de plusieurs T se présentant, le laboratoire [2] en a compté 5, dont le dernier est la première base d'un codon de terminaison TAA, et dont la suite est considérée comme 3' non codante ; le laboratoire [1] n'en a compté que 4, le codon suivant étant alors AAT et la séquence codante continuant plus en 3'. Les deux séquences sont donc, à partir de là, décalées d'une base. La partie déchiffrée est loin de couvrir la totalité du transcrite ; néanmoins, il a déjà été possible, dans la portion connue, de dépister des mutations à l'origine de plusieurs cas de NF1. Wallace *et al.* [1] ont cherché des mutations nouvelles, afin de

comparer le gène normal des parents et celui, modifié, du descendant ; ils ont ainsi découvert une insertion *de novo*, de 0,5 kb. Cawthon *et al.* [2], après avoir étudié plusieurs délétions, se sont efforcés de dépister des mutations ponctuelles dans de courts segments d'ADN. Ils ont employé la méthode des polymorphismes de conformation en simples brins (*single strand conformation polymorphism, SSCP*), qui, dans certaines conditions techniques, montre une différence de migration entre deux séquences qui ne diffèrent que par une seule base ; on peut ainsi localiser sur gel un mutant ponctuel, puis réamplifier l'ADN de la bande et analyser la mutation. Appliquant cette méthode à 70 cas de NF1 et 60 témoins, les auteurs ont identifié chez 6 malades un allèle modifié. Deux altérations étaient particulièrement significatives : dans un cas, une leucine était remplacée par une proline, dans le second, une arginine par un codon stop. On peut remarquer que la découverte de 6 mutations sur 72 cas, en explorant une zone qui ne dépasse pas 10 % de la séquence totale du transcrite, fait penser que les mutations de ce type sont très fréquentes dans la NF1, beaucoup plus que dans la maladie de Duchenne par exemple.

Les conclusions que l'on peut tirer de ces travaux sont de grande importance : l'identification du gène est certaine, après une compétition ardente qui a vu les concurrents arriver au poteau *ex aequo*, publiant tous deux le 13 juillet 1990, l'un dans *Science*, l'autre dans *Cell*. Le gène est de très grande taille, entre 500 et 2 000 kb, et un de ses introns contient au moins trois gènes fonction-

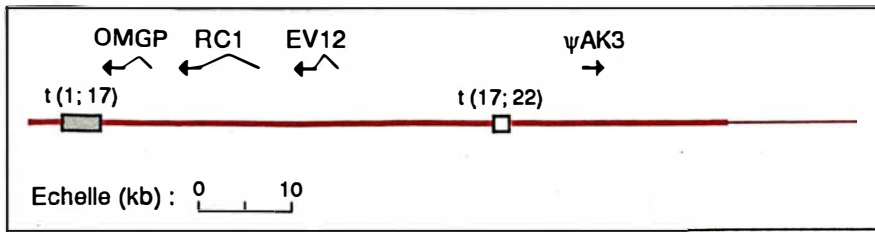


Figure 1. **La partie du gène NF1 au voisinage des translocations.** En blanc : les zones de translocation. Les gènes OMGP, RC1 et EV12 sont en orientation inverse. A droite des translocations, on a identifié un pseudogène apparenté à l'adénylate kinase 3 (ψ AK3).

nels et en orientation inverse [3] (figure 1). La proportion, chez les malades, des délétions et des mutations ponctuelles reste à définir, puisque la plus grande partie du transcrit n'est pas encore séquencée. La portion connue ne présente aucune homologie avec d'autres gènes, ni de caractéristiques fonctionnelles particulières.

Beaucoup de questions restent posées, qu'un proche avenir permettra d'attaquer. La première tâche est de compléter la séquence de l'ADNc et de la protéine, puis de déterminer la localisation cellulaire de cette dernière et de tenter ensuite de définir son rôle. Le transcrit est retrouvé dans de nombreux organes, alors que la maladie s'en prend surtout — mais non exclusivement — au système nerveux. Ce phénomène n'est pas exceptionnel et est retrouvé, par exemple, dans le rétinoblastome. L'analyse des mutations s'efforcera ensuite d'expliquer l'extrême variabilité clinique, qui va de quelques taches cutanées au retard mental et aux tumeurs malignes. Mais c'est actuellement le mode de fonctionnement du gène et de ses altérations qui pose les problèmes les plus intéressants. La NF1 possède une transmission dominante ; la rupture ou l'inactivation d'un seul allèle suffit-elle à déclencher la maladie ? La théorie la plus séduisante voudrait que le gène NF1 fasse partie des supresseurs de tumeurs ; dans ce cas, l'affection serait en fait récessive, et il faudrait deux événements pour la provoquer : l'un, hérité ou mutationnel, dans le génome, l'autre, somatique, survenant dans un clone qui se multiplierait. Cette théorie ne peut être testée dans les neurofibromes,

qui ne sont pas clonaux ; mais elle sera mise à l'épreuve dans des tumeurs malignes, des schwannomes, présentes chez certains malades : on devrait y trouver deux gènes mutés, une mutation étant héritée, l'autre nouvelle. Rappelons qu'une hypothèse semblable a été soulevée dans le cas des neurinomes de l'acoustique, que l'on rencontre dans la neurofibromatose de type 2, dont le gène est localisé sur le chromosome 22 (*m/s*, n° 7, vol. 3, p. 424).

Le dernier problème, et non le moindre, est celui du mode de fonctionnement du gène. Comme d'autres gènes géants, NF1 semble constitué de nombreux petits exons séparés par des introns dont certains sont de grande taille. Dans un de ces introns sont « enfouis » plusieurs exons apparemment fonctionnels, puisqu'on en connaît des transcrits, et en orientation inverse de celle de NF1 lui-même (figure 1). Une telle situation est rare chez les mammifères, et n'est connue chez l'homme que pour un intron dans le gène du facteur VIII [5]. Le fonctionnement de l'ensemble est encore mystérieux. On peut penser que l'activation de EV12, RC1 et OMGP pourrait interférer avec celle de NF1, soit parce que leur transcription simultanée serait impossible, soit par formation de double brin entre ARN sens et antisens. Une délétion limitée, empêchant la transcription de NF1, mais n'englobant pas ces trois gènes, pourrait provoquer leur hyperfonctionnement. Par exemple, OMGP possède probablement une importance fonctionnelle, car c'est une molécule d'adhésion des oligodendrocytes. Les dysfonctionnements des gènes enfouis pourraient intervenir

dans la genèse de la variabilité clinique de la NF1.

La découverte considérable qu'est l'identification du gène de la NF1 ouvre ainsi la porte à des travaux importants, à la fois pour la compréhension de la maladie et pour celle de ces énigmes génétiques que constituent les gènes enfouis.

J.-C. D.

Note ajoutée aux épreuves

Comme cela est rapporté dans un flash paru dans le dernier numéro de *m/s*, la protéine NF1 semble proche de la protéine GAP (*GTPase activating protein*) de vertébrés, et surtout de levures. Un défaut d'inactivation d'une G-protéine par hydrolyse de son GTP lié pourrait entraîner la persistance d'un signal mitogénique et une hyperprolifération [6, 7].

- Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene : identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990 ; 249 : 181-6.
- Cawthon RM, Weiss R, Xu G, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene : cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 1990 ; 62 : 193-201.
- Viskochil D, Buchberg A, Xu G, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 1990 ; 62 : 187-92.
- Roberts L. Down to the wire for the NF gene. *Science* 1990 ; 249 : 236-8.
- Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G Jr, Gitschier J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics* 1990 ; 7 : 1-11.
- Xu G, O'Connell P, Viskochil D, et al. The neurofibromatosis type-1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 1990 ; 62 : 599-608.
- Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG. Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 genes and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathways. *Nature* 1990 ; 347 : 291-4.