

## **Les transcrits au service de la physiopathologie moléculaire : l'exemple des délétions du gène de la dystrophine**

La dystrophine est une protéine de découverte récente [4-5]. Son altération quantitative et/ou qualitative peut engendrer deux phénotypes cliniques de gravité très différente : la dystrophie de Duchenne (DMD), qui aboutit inéluctablement au décès autour de la vingtième année, et la myopathie de Becker (BMD), nettement moins invalidante.

L'anomalie moléculaire la plus fréquemment rencontrée dans ces maladies est la délétion (plus de 65 % des cas). La localisation et la taille de ces délétions moléculaires sont extrêmement variables. Aucune corrélation n'ayant pu être établie entre la taille ou la localisation délétionnelle et la

sévérité du phénotype clinique, Monaco *et al.* [8] ont proposé et étayé une élégante hypothèse. En effet, une délétion intragénique peut avoir deux types de retentissement sur le produit protéique : soit elle entraîne un décalage du cadre de lecture, aboutissant à un transcrite erroné et à une protéine instable ou écourtée par la présence inopinée d'un codon stop dans le nouveau cadre de lecture ; soit elle maintient le cadre de lecture ouvert, aboutissant à une protéine dont certains acides aminés sont portés manquants (*figure 1*). Ainsi sont d'emblée esquissées les deux formes cliniques, conséquence directe de la perte de la

phase dans le type Duchenne ou de sa conservation dans le type Becker. Une analyse étendue à plus de 200 délétions [6] a confirmé cette hypothèse dans environ 92 % des cas et l'a réfutée dans les 8 % restants qui sont donc constitués de cas Becker présentant une délétion interrompant le cadre de lecture, ou de cas Duchenne avec délétion respectant ce même cadre. Cette vérification de l'hypothèse de Monaco a été effectuée sur le plan génomique, c'est-à-dire par déduction des données du *Southern blot* grâce à la connaissance des limites exoniques du gène. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait permis de vérifier la séquence du transcrite mature aux bornes de la délétion, preuve ultime pourtant de l'exactitude de cette théorie du cadre de lecture. Nous avons choisi d'analyser les conséquences de plusieurs délétions moléculaires sur le taux et la maturation du transcrite, et de les corréler au phénotype clinique observé [2].

**Influence d'une délétion sur le taux du transcrite.** Trois portions du message de la dystrophine ont été amplifiées par ADNc-PCR à partir d'extraits d'ARN issus de biopsies musculaires de plusieurs patients Duchenne ou Becker présentant une délétion interne du gène. Cette analyse quantitative a permis de corréler le taux de transcrite à l'état supposé du cadre de lecture. En effet, dans les cas où la délétion interrompt le cadre de lecture, l'abondance du transcrite est trouvée inférieure à 10 % de la normale ; en revanche, lorsque le cadre reste en phase, l'abondance est normale ou légèrement diminuée. Cette observation

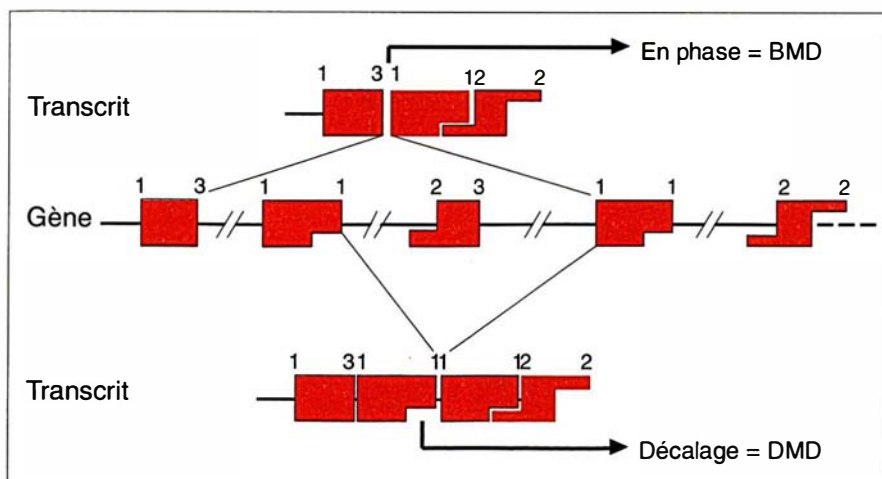


Figure 1. **La théorie du cadre de lecture.** Les exons sont représentés par des boîtes. Le premier et le dernier nucléotide de chaque exon sont représentés par un chiffre qui indique le rang qu'ils occupent dans leur triplet. Les exons qui ne sont pas constitués d'un nombre entier de codons sont représentés par des boîtes amputées. Ainsi, une délétion qui ne décale pas le cadre donnera lieu à un transcrite symbolisé par des exons emboîtés (situation du Becker). En revanche, lorsque les exons ne peuvent pas s'emboîter, le cadre est alors décalé (situation du Duchenne).

rejoint celles déjà mentionnées pour d'autres maladies, notamment pour le gène de la  $\beta$ -globine, dans lequel la présence d'un codon stop prématuré semble entraîner une diminution considérable de l'abondance du transcrit [1].

**Séquence du point de jonction des délétions.** En plaçant les amorces servant à l'amplification dans les exons bornant la délétion, il a été possible d'amplifier et de séquencer la partie correspondante du transcrit, seule vérification précise du cadre de lecture. Cette analyse a été effectuée à partir des biopsies musculaires de patients Duchenne et de patients Becker dont l'ADN avait au préalable révélé une délétion en accord avec la théorie de Monaco [3]. Nous avons ainsi pu confirmer la phase attendue, décalée dans les cas DMD et non dans les cas BMD, en séquencant la jonction précise des exons aux bornes de la délétion.

**Qu'en est-il des exceptions à la théorie du cadre de lecture ?** La même approche a été entreprise pour étudier le muscle de deux myopathes de Duchenne. L'ADN de l'un d'eux présente une délétion du 3<sup>e</sup> au 34<sup>e</sup> exon inclus du gène de la dystrophine avec respect du cadre de lecture. En plaçant des amorces dans le 1<sup>er</sup> et le 36<sup>e</sup> exon, un fragment de 320 paires de bases a été amplifié à partir des messagers totaux extraits d'une biopsie musculaire. Après séquençage, ce fragment correspond à la jonction précise entre le 2<sup>e</sup> et le 35<sup>e</sup> exon, n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture. D'autres formes minoritaires, correspondant à d'autres épissages, ont également été détectées, mais, là encore, ne décalent pas le cadre de lecture. L'analyse en *Western blot* des protéines musculaires de ce patient ne permet la détection d'aucune trace de dystrophine. L'analyse d'un autre cas présentant une délétion différente a donné les mêmes résultats. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces cas particuliers est une instabilité protéique qui pourrait être due à la délétion des régions particulières de la protéine (en particulier de régions

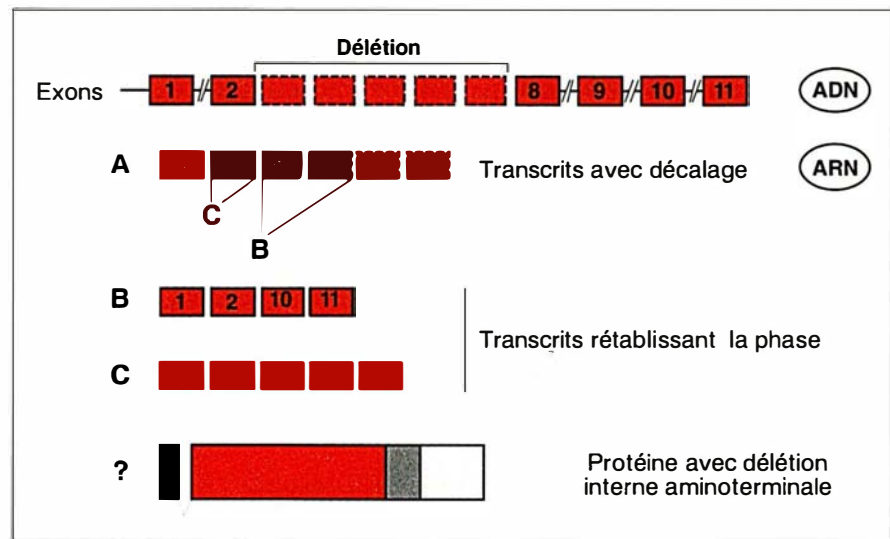


Figure 2. **Cas Becker avec délétion décalant le cadre de lecture.** En haut, la délétion est schématisée en pointillé sur l'ADN, les exons étant représentés par des boîtes. Les différentes formes de transcrits détectés sont la forme A, majoritaire, décalant le cadre et les formes B et C, minoritaires, rétablissant le cadre de lecture. En bas, le produit protéique supposé engendré par ces transcrits alternatifs.

charnières riches en proline dont l'importance a déjà été mentionnée par M. Koenig [3] (voir *m/s* n° 3, vol. 6, p. 308).

L'autre type d'exception, à savoir une délétion décalant le cadre de lecture chez un patient Becker, a également été envisagé. Il s'agissait de deux patients non apparentés porteurs d'une même délétion moléculaire emportant les exons 3 à 7 inclus. Cette délétion constitue la plus fréquente des exceptions, et peut également être à l'origine d'un phénotype sévère (type DMD). Une amplification avec différents couples d'oligonucléotides a permis de détecter un transcrit majoritaire de nature attendue, c'est-à-dire rapprochant les exons 2 et 8 (forme A de la figure 2), mais également plusieurs autres formes moins abondantes (formes B et C, figure 2), dont deux rétablissant le cadre de lecture. Ces transcrits alternatifs sont également détectés dans le muscle normal. La quantité globale des transcrits détectés dans les deux

cas pathologiques est peu différente de la normale. L'analyse protéique en *Western blot* et en immunocytochimie a confirmé la présence d'une protéine diminuée en quantité et en taille, cette dernière étant compatible avec la forme minoritaire en phase du transcrit. Les conclusions que l'on peut tirer de cette expérience sont de deux ordres : d'une part, la présence d'un codon stop ne suffit pas à entraîner une chute importante de l'abondance du transcrit, comme les résultats de quantification commentés plus haut auraient pu le laisser suggérer ; d'autre part, la traduction des transcrits alternatifs en phase peut expliquer le phénotype clinique modéré présenté par ces patients.

Cette étude nous permet de penser que la nature de la délétion, et notamment ses limites introniques, influencent l'abondance du transcrit primaire. De celle-ci dépendra la possibilité d'engendrer des transcrits alternatifs réparateurs. Cette hypothèse permet de comprendre pour-

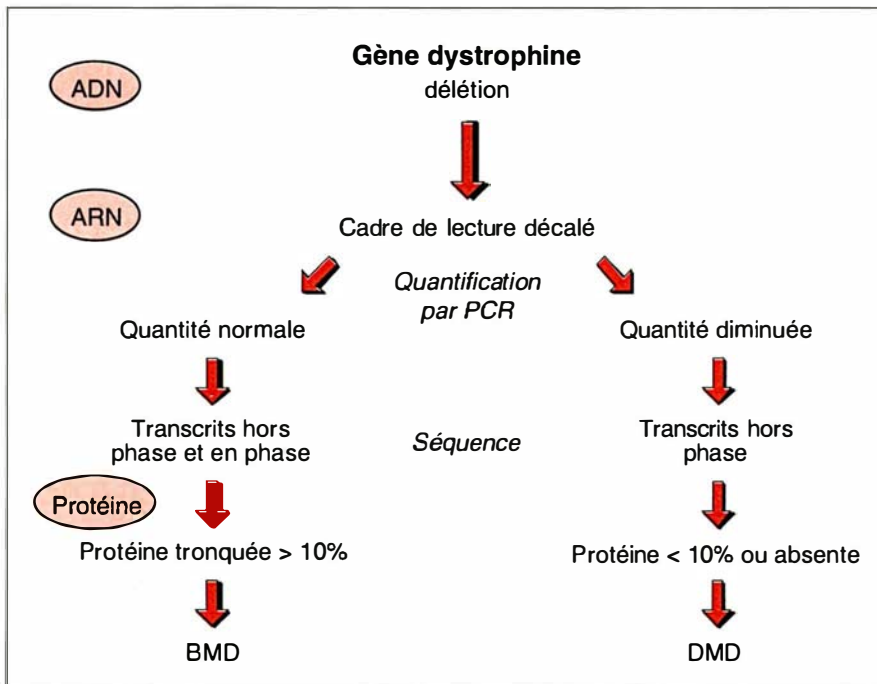


Figure 3. **Hypothèse qui pourrait expliquer comment une même délétion qui décale le cadre de lecture pourrait entraîner, dans certains cas, une dystrophie modérée (Becker, BMD et forme intermédiaire) et, dans d'autres cas, une myopathie sévère (Duchenne, DMD).**

quoï une même délétion, comme celle des exons 3 à 7, peut être responsable d'un phénotype Duchenne comme d'un phénotype Becker (figure 3). Enfin, cette approche expérimentale des conséquences d'un remaniement moléculaire sur l'abondance d'un transcrit et sur sa maturation pourrait servir de modèle à la compréhension de l'hétérogénéité clinique d'autres maladies.

#### Hélène Gilgenkrantz

Docteur en médecine, poste d'accueil Inserm pour ancien interne

#### Jamel Chelly

Docteur en médecine, chargé de recherche au Crns, ICGM, Inserm U.129, 24 rue du Faubourg St-Jacques, 75014 Paris, France.

#### RÉFÉRENCES

1. Baserga SJ, Benz EJ. Nonsense mutations in the human  $\beta$  globin gene affect mRNA metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 2056-60.

2. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, *et al.* Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and providing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990 ; 63 : 1239-48.

3. Gilgenkrantz H, Chelly J, Lambert M, *et al.* Analysis of molecular deletions with cDNA probes in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1989 ; 5 : 574-580.

4. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50 : 509-17.

5. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-28.

6. Koenig M, Begg AH, Moyer M, *et al.* The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy : correlation of severity with the type of deletion. *Am J Hum Genet* 1989 ; 45 : 498-506.

7. Koenig M, Kunkel LM. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 1-7.

8. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988 ; 2 : 90-5.