

# Génétique moléculaire du pseudoxanthome élastique

O. LE SAUX (1), L. MARTIN (2)

**L**e pseudoxanthome élastique (PXE) est une maladie héréditaire (OMIM 177850, 264800) affectant environ une personne sur 100 000 et dont l'expression phénotypique est caractérisée par une minéralisation des fibres élastiques des tissus cutané, vasculaire et oculaire.

## Génétique du pseudoxanthome élastique

Les symptômes cutanés d'un possible « xanthelasma » ont été décrits pour la première fois en 1884 par Félix Balzer à l'Hôpital Saint-Louis [1], mais ce n'est qu'en 1896 que Jean Darier associa ces lésions à une entité clinique distincte qu'il nommera pseudoxanthoma élastique [2]. En 1929, l'ophtalmologiste Ester Grönblad et le dermatologiste James Stranberg remarquèrent indépendamment que les lésions cutanées du PXE étaient associées à des lésions oculaires décrites bien des années auparavant [3] comme des lignes dentelées et irrégulières connues aujourd'hui sous le nom de stries angioïdes [4, 5]. Le PXE fut par la suite fréquemment dénommé syndrome de Grönblad-Stranberg, mais le terme de pseudoxanthome élastique s'est aujourd'hui imposé, en dépit d'autres propositions comme *elastosis dystrophica* ou *elastodysplasia calcificans* [6, 7].

Berlyne et coll. furent les premiers en 1961 à décrire une transmission héréditaire pour le PXE [8]. Pope, vers le milieu des années 70, proposa ce qui constitue la base d'une controverse en passe d'être résolue grâce aux récents apports de la génétique moléculaire. En effet, dans ses articles de 1974 et 1975, il décrivit quatre sous-types de PXE basés sur les manifestations cliniques [9-11] ; deux d'entre eux étaient transmis de façon autosomique récessive, les deux autres de façon dominante. En 1988, Neldner discuta cette classification dans une vaste étude et arriva à la conclusion qu'il n'existait pas de sous-types et que la majorité des cas de PXE (97 p. 100) étaient autosomiques récessifs [12]. Cette conclusion, en avance sur son temps, n'eut pas l'impact escompté du fait de l'absence d'outil de diagnostic moléculaire la validant. Récemment, lors d'une conférence à Bethesda, Maryland (USA), la plupart des acteurs de cette controverse, s'accordèrent finalement sur l'existence de deux formes de transmission héréditaire du PXE, une majoritaire autosomique récessive et une minoritaire autosomique dominante sans distinction de phénotype [13]. Cette déclaration rejoignait ainsi les vues de Neldner [14]. Il restait, à ce stade, à identifier le(s) gène(s) responsable(s) du PXE.

## Un locus en 16p13.1

Lors de cette conférence, un locus sur le bras court du chromosome 16p13.1 fut annoncé par deux équipes [13]. Le premier locus publié a été identifié en utilisant des familles consanguines avec une apparente transmission auto-

somique récessive du PXE [15]. Van Soest et coll. ont utilisé un total de 374 microsatellites distribués sur la totalité du génome et en moyenne distants de 10 à 15 cM (un microsatellite est une séquence hautement polymorphique de quelques dizaines de bases composées d'une succession de di-, tri- ou tétranucléotides ; ces séquences sont considérées comme des « marqueurs » génétiques). Vingt locus homozygotes ont été identifiés. Une analyse approfondie de l'un de ces 20 loci, révéla une région de 3 à 4 cM étroitement liée au PXE comprise entre les marqueurs D16S3079 et D16S3103, et un lod score maximum de 6,27 associé au marqueur D16S764 (un lod score est la valeur statistique logarithmique considérée comme significative quand elle est égale ou supérieure à 3). Une deuxième équipe publia des résultats identiques peu de temps après [16]. Struk et coll. ont aussi utilisé une approche globale, à l'échelle du génome, mais les méthodes employées furent différentes. En effet, leur stratégie s'est déroulée en deux étapes. La première consista à utiliser des individus affectés provenant de 38 familles dans une analyse non paramétrique de partage d'allèles avec 169 microsatellites. Trois marqueurs sur le bras court du chromosome 16 présentèrent un niveau « anormalement » élevé de partage d'allèle. La deuxième étape fit appel à 50 familles avec des formes autosomiques récessives (42 familles) et dominantes (8 familles) qui ont été analysées à l'aide de nombreux marqueurs faiblement espacés et couvrant la région incriminée. Les résultats obtenus confirmèrent ceux de la première étape et furent particulièrement éloquentes puisque le lod score maximal

(1) Pacific Biomedical Research Center, University of Hawai'i at Manoa, 1993 East-West Road, Honolulu, Hawai'i 96822, USA.

(2) Consultation multidisciplinaire PXE, Service de Dermatologie, Hôpital Porte-Madeleine, BP 2439, CHR d'Orléans, 45032 Orléans Cedex 1.

Tirés à part : O. LE SAUX, à l'adresse ci-dessus.  
E-mail : olivier@pbr.hawaii.edu

atteint (21, 27) associé avec le marqueur D16S500 fut sans précédent pour une étude de ce genre. La région contenant le ou les gène(s) responsable(s) du PXE a été réduite à 4,8 cM et localisée entre les marqueurs D16S500 et D16S3103. Struk et coll. ont également évoqué la possibilité d'une hétérogénéité de locus et la présence d'au moins deux gènes « PXE » dans des locus séparés.

### Identification des gènes candidats

L'identification du locus fut un énorme pas en avant mais cette région du génome comportait un nombre potentiel de gènes très important. Il fallait donc réduire la zone d'intérêt afin de pouvoir identifier une liste minimale de gènes candidats. Ce fut fait en 1999 [17]. Trente six familles provenant de plusieurs pays européens ainsi que des Etats Unis ont été analysées. La position du locus sur le chromosome 16 a été confirmée avec un lod score maximum de 8,7 associé au marqueur D16S3017. Ces résultats préliminaires ne permirent pas de réduire la région critique, mais ils exclurent la possibilité d'une hétérogénéité de locus en 16p13.1. Une autre approche fut donc employée. La disponibilité d'un grand nombre de familles (36) permit de rechercher et d'identifier des événements de recombinaisons sur la base d'une analyse haplotypique réalisée avec une série de 10 microsatellites s'étendant sur 23 cM et couvrant le domaine 16p13.1 ainsi que les zones adjacentes. Sur 36 familles, 17 présentèrent des cross-over dans la zone d'intérêt, dont 7 étaient particulièrement informatifs. Une famille britannique peut être citée en exemple puisque deux de cinq frères souffrant de PXE présentaient des recombinaisons en sens opposés, permettant de réduire le locus de 4,8 à 1,2 cM. La comparaison de toutes les recombinaisons identifiées a permis de confiner la position du gène « PXE » dans un domaine borné par deux marqueurs, D16S3060 et D16S79 distant de 0 cM. L'absence de « distance génétique » suggérait une distance physique minimale qui put être déterminée grâce aux apports

du projet Génome Humain. En effet, la région entre les deux marqueurs D16S3060 et D16S79 était couverte par 12 clones BAC chevauchant, dont 7 étaient séquencés dans leur totalité (les BAC ou « Bacterial Artificial Chromosomes » sont couramment utilisés comme vecteurs de clonage bactériens pour la constitution de banque de fragments d'ADN compris entre 100 et 300 kb). Cela permit d'une part de déterminer que les marqueurs D16S3060 et D16S79 étaient séparés d'environ 820 kb et d'autre part d'identifier six gènes candidats dont deux étaient identiques. Ces gènes codaient pour une isoforme de la myosine (MYH11), deux protéines de la famille des transporteurs ATP binding cassette ou ABC (ABCC1 et 6 alias MRP1 et 6), et deux protéines non caractérisées nommées PM5 et UNK (unknown). Cette dernière protéine sera plus tard nommée NPIP (Nuclear Pore Interacting Protein). Cai et coll. caractérisèrent un locus similaire quelques mois plus tard [18]. La méthode employée fit appel également à la recherche d'évènements de recombinaisons et identifia une région réduite cette fois à 500 kb environ et comprise entre les marqueurs D16B9621 et D16S764. Cette région du chromosome 16 était couverte par 10 clones BAC dont les 7 clones préalablement identifiés. La liste des gènes candidats était identique à la précédente à l'exception du gène *MYH11* exclu grâce à l'emploi du marqueur D16B9621.

### Le gène « PXE »

A la suite des publications de la liste des gènes candidats, plusieurs groupes ont entrepris une recherche systématique de mutations en utilisant de nombreuses familles d'origines variées. Simultanément, quatre articles décrivant la présence de mutations associées au PXE ont été publiés [19-22] suivis par un cinquième confirmant l'identité du gène quelques mois plus tard [23]. Les premières mutations PXE ont été découvertes dans un des deux gènes codant pour un transporteur ABC, *ABCC6*. Aucun des autres gènes analysés (*ABCC1*, *PM5* et *NPIP*) ne

présentait de semblables altérations moléculaires, seuls quelques variants polymorphiques ont été observés [20, 21]. Les procédures utilisées varièrent du séquençage direct des régions codantes des gènes candidats à des méthodes de détection indirecte de mutations telles que le Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) et le Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis (CSGE). Ces dernières méthodes requièrent une amplification PCR préalable et sont donc limitées à la détection de mutations de type substitution ou insertion/délétion de quelques nucléotides. Les délétions de grande taille (de quelques kb à plusieurs dizaines de kb) sont plus difficiles à détecter et ne le sont généralement que de façon très indirecte. Pour ces raisons, les premières caractérisations de mutations PXE firent seulement état de deux larges délétions de limites non déterminées [19, 21]. Un récent article de Ringpfeil et coll. vient de combler cette lacune pour une d'entre elles [24]. En revanche, un grand nombre de mutations impliquant la substitution d'un seul nucléotide ont été trouvées. Ces mutations sont de plusieurs types. Les plus fréquentes sont des substitutions modifiant le sens d'un codon (mutations « faux-sens » ou « non-sens »). Par exemple, la substitution du nucléotide 3413 (G > A) a changé le sens du codon 1138 qui code un résidu arginyl en un résidu glutamyl (faux-sens), et la substitution du nucléotide 3421 (C > T) attribue au codon 1141, codant normalement un résidu arginyl, le sens « STOP » (non-sens). Les autres mutations décrites affectent un site d'épissage de l'exon 21, correspondant à des délétions de 1 à 22 nucléotides ou à des insertions de 4 nucléotides perturbant le cadre de lecture du gène (mutations dites « frameshift ») [19, 20]. Il est difficile de distinguer une mutation faux-sens d'une substitution neutre (polymorphique) sans effet sur la fonction ou la structure protéique. Afin d'attribuer la responsabilité du développement d'un phénotype PXE aux différentes mutations identifiées, l'absence de la substitution suspecte dans une population normale (en

moyenne 100 individus) et sa co-ségrégation avec le phénotype ont donc été systématiquement vérifiées.

La plupart des mutations décrites à ce jour ont été trouvées sous formes homozygotes ou hétérozygotes composites (association de deux mutations différentes). Ces altérations ont été associées avec un PXE autosomique récessif. Cependant, deux types de mutations hétérozygotes (R1141X et insertion AGAA) ont été associées avec un PXE autosomique apparemment dominant [19]. Il est surprenant qu'une de ces mutations (R1141X) ait été retrouvée à la fois chez des patients avec un PXE autosomique récessif et chez des patients avec un PXE dominant. En effet, les formes récessives et dominantes d'une même affection héréditaire sont généralement dues à des mutations différentes dans un même gène ou bien à des altérations moléculaires dans des gènes distincts. Par exemple, pour les formes dystrophiques d'épidermolyse bulleuse héréditaire, les différentes affections autosomiques récessives et dominantes sont dues à des mutations distinctes du gène *COL7A1* [25]. Etant donné la nouveauté de ces résultats et la présence possible de symptômes chez des porteurs hétérozygotes [15, 26], il convient donc de les prendre avec prudence.

Deux éléments sont importants à retenir. Le premier est que la plupart des mutations décrites sont uniques. A ce jour, seules deux mutations semblent être récurrentes. La mutation R1141X a été décrite chez de multiples patients aux origines diverses [19-24]. De plus, une délétion récemment caractérisée de 16,5 kb médiée par des séquences *Alu* et comprenant les régions de l'intron 22 à 29 semble également récurrente [24]. L'origine de ces deux mutations récurrentes est inconnue. Cependant, sur la base d'une analyse haplotypique, Ringpfeil et coll. ont avancé l'hypothèse que la délétion de 16,5 kb serait apparue indépendamment dans quatre familles d'origine européenne [24]. La même hypothèse pourrait également expliquer la présence de la seconde mutation récurrente (R1141X) dans des populations d'origines variées [20]. Le deuxième

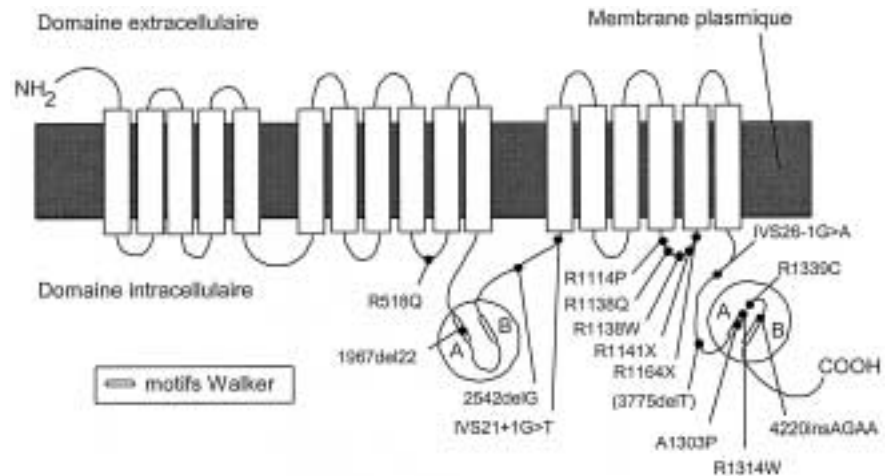


Fig. 1. Structure prédictive transmembranaire de la protéine ABCC6. Les positions respectives des différentes mutations publiées à ce jour sont représentées par des cercles noirs. Les deux régions encadrées représentent les sites de fixation et d'hydrolyse de l'ATP dont les motifs Walker caractéristiques sont indiqués par les lettres A et B.

élément a trait à la position des mutations sur le gène. En effet, à l'exception des larges délétions dont l'effet est global, la quasi totalité des altérations moléculaires sont groupées dans la partie 3' du gène et affectent la région C-terminale de la protéine, notamment le site de fixation de l'ATP (fig. 1). La raison de ceci se trouve sûrement dans la fonction de cette partie de la protéine ou dans la structure génomique entourant les régions codantes du gène, mais cela reste encore à déterminer expérimentalement.

### Conclusion et perspectives

La découverte du gène responsable du PXE est un événement qui bouleverse un grand nombre d'idées reçues. Le diagnostic moléculaire du PXE est aujourd'hui possible. Cependant, la diversité des mutations rencontrées et l'absence d'un outil de diagnostic systématique utilisable de façon routinière font que le conseil génétique demeure difficile. Le PXE était considéré jusqu'alors comme une affection prototype des maladies de la fibre élastique. Le positionnement du gène « PXE » sur le bras court du chromosome 16 créa une surprise puisque il élimina l'implication d'un gène codant un élément connu de la fibre élastique. L'identification de mutations dans le gène *ABCC6* fut également inattendue

et a fait du PXE une affection métabolique complexe. En effet, *ABCC6* est une protéine transmembranaire de la famille des transporteurs ABC et la relation entre ce type de protéine et le PXE est d'autant plus difficile à expliquer que le gène n'est pas ou peu exprimé dans les tissus affectés, dermique, cardio-vasculaire et oculaire. Les sites d'expression majoritaires sont en effet situés dans le rein et le foie. La découverte des caractéristiques moléculaires du PXE n'a fait que lever une partie du voile entourant cette maladie. Le PXE est-il dû à un défaut d'un mécanisme encore inconnu de détoxification ? Quelle est la nature du/des composé(s) transportés par *ABCC6* ? La réponse à ces questions est aujourd'hui une priorité afin de mieux comprendre cette maladie complexe et d'envisager une solution thérapeutique.

### Références

- Balzer F. Recherches sur les caractères anatomiques du xanthelasma. Arch Physiol (Serie 3) 1884;4:65-80.
- Darier J. Le Pseudo-xanthoma élastique. Ann Dermatol Syphilol 1896;12:11-7.
- Doyme R. Choroidal and retinal changes the result of blows on the eye. Trans Ophthalmol Soc UK 1889;9:128.

4. Groenblad E. Angioid streaks : pseudoxanthoma elasticum : vorloeufige mitteilung. *Z Ophthalmol (Copenh)* 1929;7:329.
5. Strandberg J. Pseudoxanthoma elasticum. *Z Haut Geschlechtskr* 1929;31:689-94.
6. Huang S, Kumar G, Steele HD, Parker JO. Cardiac involvement in pseudoxanthoma elasticum. Report of a case. *Am Heart J* 1967;74:680-6.
7. Huang SN, Steele HD, Kumar G, Parker JO. Ultrastructural changes of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum. A study of histogenesis. *Arch Pathol* 1967;83:108-13.
8. Berlyne GM, Bulmer MG, Platt RL. The genetics of pseudoxanthoma elasticum. *Quart J Med* 1961;30:201-12.
9. Pope FM. Two types of autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum. *Arch Dermatol* 1974;110:209-12.
10. Pope FM. Autosomal dominant pseudoxanthoma elasticum. *J Med Genet* 1974;11:152-7.
11. Pope FM. Historical evidence for the genetic heterogeneity of pseudoxanthoma elasticum. *Br J Dermatol* 1975;92:493-509.
12. Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol* 1988;6:1-159.
13. Uitto J, Boyd CD, Lebowl MG, Moshell AN, Rosenbloom J, Terry S. International Centennial Meeting on Pseudoxanthoma Elasticum : progress in PXE research. *J Invest Dermatol* 1998;110:840-2.
14. Neldner KH. Pseudoxanthoma elasticum. *Int J Dermatol* 1988;27:98-100.
15. van Soest S, Swart J, Tijmes N, Sandkuijl LA, Rommers J, Bergen AA. A locus for autosomal recessive pseudoxanthoma elasticum, with penetrance of vascular symptoms in carriers, maps to chromosome 16p13.1. *Genome Res* 1997;7:830-4.
16. Struk B, Neldner KH, Rao VS, St Jean P, Lindpaintner K. Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Hum Mol Genet* 1997;6:1823-8.
17. Le Saux O, Urban Z, Goring HH, Csiszar K, Pope FM, Richards A et al. Pseudoxanthoma elasticum maps to an 820-kb region of the p13.1 region of chromosome 16. *Genomics* 1999;62:1-10.
18. Cai L, Struk B, Adams MD, Ji W, HaafT, Kang HL et al. A 500-kb region on chromosome 16p13.1 contains the pseudoxanthoma elasticum locus : high-resolution mapping and genomic structure. *J Mol Med* 2000;78:36-46.
19. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:228-31.
20. Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quaglino D et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:223-7.
21. Ringpfeil F, Lebowl MG, Christiano AM, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum : mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6001-6.
22. Struk B, Cai L, Zach S, Ji W, Chung J, Lumsden A et al. Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 2000;78:282-6.
23. Germain DP, Perdu J, Remones V, Jeunemaitre X. Homozygosity for the R1268Q mutation in MRP6, the pseudoxanthoma elasticum gene, is not disease-causing. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:297-301.
24. Ringpfeil F, Nakano A, Uitto J, Pulkkinen L. Compound heterozygosity for a recurrent 16.5-kb Alu-mediated deletion mutation and single-base-pair substitutions in the ABCC6 gene results in pseudoxanthoma elasticum. *Am J Hum Genet* 2001;68:642-52.
25. Uitto J, Pulkkinen L, Christiano AM. Molecular basis of the dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa : mutations in the type VII collagen and kalinin (laminin 5) genes. *J Invest Dermatol* 1994;103:39S-46S.
26. Bacchelli B, Quaglino D, Gheduzzi D, Tapparelli F, Boraldi F, Trolli B et al. Identification of heterozygote carriers in families with a recessive form of pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Mod Pathol* 1999;12:1112-23.