

l'homme, et les nombreuses manipulations requises par l'extinction de *cdx2* et sa réexpression posent en elles-mêmes des problèmes éthiques difficiles. Quant à la technique proposée par Y. Chung, bien que l'isolement de blastomères soit pratiqué pour le diagnostic génétique préimplantatoire (DPI) dans les familles où il existe un risque de maladie génétique grave, leur capacité à établir des CSE n'est pas connue, et une telle démarche soulèverait aussi de très nombreuses questions [7-9]. ♦

Derivation of embryonic stem cells

REMERCIEMENTS

Je remercie D.J. Taupin pour la relecture de ce manuscrit. P.T. est supporté par des subventions du NMRC, BMRC, et de la Juvenile Diabetes Research Foundation.

RÉFÉRENCES

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 ; 282 : 1145-7 et 1827 (erratum).
2. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006 ; 439 : 216-9.
3. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996 ; 380 : 64-6.

4. Hurlbut WB. Altered nuclear transfer as a morally acceptable means for the procurement of human embryonic stem cells. *Perspect Biol Med* 2005 ; 48 : 211-28.
5. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 2005 ; 123 : 917-29.
6. Meissner A, Jaenisch R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* 2006 ; 439 : 212-5.
7. Weissman IL. Medicine : politic stem cells. *Nature* 2006 ; 439 : 145-7.
8. Melton DA, Daley GO, Jennings CG. Altered nuclear transfer in stem-cell research - a flawed proposal. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 2791-2.
9. Solter D. Politically correct human embryonic stem cells ? *N Engl J Med* 2005 ; 353 : 2321-2.

NOUVELLE

**Les mutations
« gain de glycosylation »**

Guillaume Vogt, Ariane Chaggier, Nadia Chuzhanova, Jacqueline Feinberg, Claire Fieschi, Stéphanie Boisson-Dupuis, Alexandre Alcaïs, Laurent Abel, David N. Cooper, Jean-Laurent Casanova

► L'étude du syndrome de prédisposition mendélienne aux infections mycobactériennes (MIM 209950) a permis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires de l'immunité anti-mycobactérienne chez l'homme. En effet, certains malades présentent une vulnérabilité héréditaire spécifique vis-à-vis des infections mycobactériennes [1-3]. Des études moléculaires ont montré qu'ils sont porteurs de mutations germinales dans cinq gènes participant aux voies d'activation cellulaire de l'interferon- γ (IFN- γ) ou de l'interleukine-12 (IL-12). Cela met en évidence le rôle indispensable de l'IFN- γ et de son principal inducteur l'IL-12 [4-10], dans le contrôle des infections mycobactériennes chez l'homme [11-13].

Nous avons récemment réalisé une étude sur trois enfants présentant des infections mycobactériennes disséminées chez lesquels nous avons trouvé une mutation faux sens T168N dans le gène *IFNGR2*.

Ils sont issus de deux familles consanguines, non apparentées entre elles. La première patiente est originaire d'Iran et a développé une infection disséminée à l'âge d'un mois après vaccination par le bacille de Calmette et Guérin (BCG, c'est-à-dire *M. bovis* atténué). Actuellement âgée de deux ans et demi, elle est toujours traitée par des antibiotiques antimycobactériens. Les deux autres malades sont deux frères originaires d'Arabie Saoudite qui avaient développé une infection disséminée à *M. fortuitum* ; le premier est mort à l'âge de six ans, et le second, âgé de cinq ans, est toujours traité par des antibiotiques antimycobactériens.

Chez ces trois enfants, nous avons identifié un défaut complet de réponse à l'IFN- γ . Les explorations ont été effectuées sur sang total [14], lignées lymphocytaires B immortalisées par le virus Epstein-Barr et sur fibroblastes transformés par l'antigène T SV40 issus des

G. Vogt, A. Chaggier, J. Feinberg, C. Fieschi, S. Boisson-Dupuis, A. Alcaïs, L. Abel : Laboratoire de Génétique humaine-Maladies infectieuses, Université René Descartes, Inserm U550, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. J.L. Casanova : Laboratoire de Génétique humaine-Maladies infectieuses, Université René Descartes, Inserm U550, Faculté de Médecine Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris, France. Département d'immunologie et d'hématologie pédiatrique, Hôpital Necker, 75015 Paris, France. French-Chinese Laboratory of Genomics and Life Sciences, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai, Chine. N. Chuzhanova : Biostatistics and Bioinformatics Unit and Institute of Medical Genetics. D.N. Cooper : Institute of Medical Genetics. Cardiff University, Cardiff CF14 4XN, Royaume-Uni. C. Fieschi : Département d'Immunopathologie, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France. vogt@necker.fr

patients. La même mutation homozygote T168N du gène *IFNGR2* a été retrouvée chez ces trois patients. Puis, par des



techniques de microscopie confocale et de biotinylation de surface cellulaire des récepteurs, nous avons démontré que la protéine IFN- γ R2 T168N mutante était exprimée, comme la protéine sauvage, à la surface cellulaire. Ces résultats attestent que le défaut de réponse n'était pas dû à une localisation cellulaire anormale ou à une absence d'expression en surface. De plus, nous avons découvert que la mutation T168N avait un poids moléculaire apparent beaucoup plus élevé que celui de la forme sauvage. Ce gain de poids moléculaire ne semblait pas correspondre au seul changement d'acide aminé causé par la mutation. En effet, la mutation crée un nouveau site consensus de glycosylation (TSTA \rightarrow NSTA) dans la chaîne 2 du récepteur de l'IFN- γ (IFN- γ R2) [15]. Jusqu'à présent les mutations entraînant un gain de glycosylation ont toujours été considérées comme rares.

Par l'utilisation de glucosidase (PNGaseF) ou d'inhibiteur chimique de la glycosylation (Tunicamycine), nous avons

ensuite formellement démontré que le gain de poids était exclusivement dû à un gain de glycosylation. Puis, par mutagenèse dirigée, nous avons montré que la nouvelle molécule d'hydrate de carbone ajoutée était en elle-même délétère, abolissant la fonction du récepteur de l'IFN- γ . La complémentation du phénotype cellulaire a été effectuée *in vitro* et *ex vivo*, en traitant les cellules des patients par un inhibiteur de la N-glycosylation (Tunicamycine) ou par le PNGaseF (Figure 1). Nous avons ainsi prouvé qu'il était possible d'effectuer une complémentation chimique, sur les cellules du patient, avec des concentrations de drogues permettant une réponse normale en terme de synthèse protéique. Ces expériences démontrent que l'ajout de cet hydrate de carbone est directement responsable du défaut de réponse à l'IFN- γ .

Une proportion importante de mutations responsables de maladies génétiques humaines pourrait donc être liée à la création de nouveaux sites

de glycosylation. Ces mutations créent un « gain de glycosylation » et définissent un nouveau groupe de maladies génétiques, ouvrant de nouvelles possibilités thérapeutiques grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la glycosylation [16]. Pour les rechercher, nous avons ensuite criblé *in silico* la banque *Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.org/>) afin d'identifier des mutations faux-sens pouvant entraîner un gain de glycosylation. À partir de 10 047 mutations dans 577 gènes codant pour des protéines circulant à travers la voie sécrétoire, nous avons trouvé 142 mutations candidates (~1,4 %) dans 77 gènes (~13,3 %). Une proportion importante de mutations causales dans les maladies génétiques humaines semble donc être liée à la création de nouveaux sites de glycosylation [16]. Le nombre de mutations responsables d'un gain de glycosylation est très significativement augmenté par rapport au nombre attendu du fait du hasard ($p = 2.10^{-7}$) (Tableau 1). Quatorze de ces gènes ainsi déterminés sont associés à des immunodéficiences primaires. En sélectionnant au hasard six mutations dans cinq gènes (*CD18*, *IL2RG*, *CD8A*, *CD40LG* et *PRF1*) codant des protéines qui transitent par le réticulum endoplasmique, les six protéines mutantes choisies au hasard dans les immuno-déficiences primaires se sont avérées toutes correspondre à un gain de glycosylation. En étudiant deux de ces mutations dans les gènes *CD18* et *CD40LG*, nous avons formellement établi par des études fonctionnelles que leur pathogénicité était liée au gain de glycosylation, démontrant l'universalité de notre hypothèse.

En conclusion

L'ajout d'une nouvelle molécule d'hydrate de carbone est responsable du phénotype cellulaire de défaut de réponse à l'IFN- γ chez les patients porteurs de la mutation T168N. De rares mutations germinales responsables d'un gain de glycosylation avaient

	Total des mutations faux-sens			Mutations faux-sens gain-de-glycosylation prédites (%)		
	1 325	577	748	1 325	577	748
Recherchées dans HGMD	20 667	10 047	10 620	246 (1,19 %)	142 (1,41 %)	104 (0,98 %)
Possible <i>in silico</i>	5 949 671	2 418 935	3 530 736	45 299 (0,76 %)	17 410 (0,72 %)	27 889 (0,79 %)
Valeur de p	-	-	-	$7 \cdot 10^{-12}$	$8 \cdot 10^{-16}$	0,04

Tableau 1. Un total de 20 667 mutations faux-sens pathogènes comprises dans 1 325 gènes ont été analysées dans la HGMD (Human Gene Mutation Database) (mise à jour de mai 2004). Parmi ces gènes, 577 codent pour des protéines qui sont prédites pour entrer dans le réticulum endoplasmique et ainsi être potentiellement glycosylées (fondé sur l'identification, *in silico*, des peptides signaux ou d'ancrages) avec une probabilité combinée supérieure à 0,75. Les 748 gènes restants sont ceux qui ne sont pas prédits pour entrer dans le réticulum endoplasmique. De ces groupes de 1 325, 577 et 748 gènes, les mutations dans 158, 77 et 81 gènes, respectivement, causent potentiellement des gains de glycosylation. Pour chacun de ces trois groupes de gènes, le nombre de mutations faux-sens pathogènes documentées, entraînant un gain de glycosylation prédit a été comparé avec le nombre total de mutations faux-sens possibles (créées *in silico*) pouvant créer un site consensus de glycosylation. Une statistique de χ^2 a ensuite été utilisée pour comparer les proportions observées avec celles attendues (valeurs de p indiquées) (adapté de [16]).

déjà été décrites dans la littérature [16]. Mais le caractère pathogène de ces nouveaux hydrates de carbone n'avait jamais été établi de façon expérimentale. Or, il s'avère qu'une proportion importante de mutations mendéliennes faux-sens, responsables de maladies génétiques, crée des sites de N-glycosylation qui pourraient être directement impliqués dans le processus pathogénique. Ces mutations faux-sens peuvent potentiellement être complétées par des inhibiteurs de la glycosylation ou par des glucosidases, comme la mutation T168N du récepteur de l'interféron- γ . Nous avons ainsi identifié une nouvelle classe de mutations définis-

sant un nouveau groupe de maladies humaines : les mutations avec gain de glycosylation. La conséquence directe de l'ajout d'une nouvelle chaîne d'hydrate de carbone, et non de la modification *per se* de l'acide aminé, serait en effet responsable d'un certain nombre de maladies humaines, ouvrant ainsi la voie à une thérapie chimique ciblée. Ce type de mutation doit être systématiquement recherché car les malades qui en sont porteurs pourraient bénéficier de traitements diminuant la glycosylation, offrant ainsi une alternative thérapeutique à la transplantation ou à la thérapie génique [16]. \diamond

Gains of glycosylation mutations

RÉFÉRENCES

1. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria : the human model. *Annu Rev Immunol* 2002 ; 20 : 581-620.
2. Casanova JL, Blanche S, Emile JF, et al. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guérin infection : a French national retrospective study. *Pediatrics* 1996 ; 98 : 774-8.
3. Casanova JL, Jouanguy E, Lamhamedi S, et al. Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. *Lancet* 1995 ; 346 : 581.
4. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 1956-61.
5. Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 2364-9.
6. Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, et al. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 2001 ; 293 : 300-3.
7. Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L, et al. A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor beta1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood* 2004 ; 104 : 2095-101.
8. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammam D, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999 ; 21 : 370-8.
9. Picard C, Fieschi C, Altare F, et al. Inherited interleukin-12 deficiency : IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 2002 ; 70 : 336-48.
10. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guérin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2658-64.
11. Casanova JL, Abel L. The human model : a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol* 2004 ; 4 : 55-66.
12. Casanova JL, Abel L. Inborn errors of immunity to infection : the rule rather than the exception. *J Exp Med* 2005 ; 202 : 197-201.
13. Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, et al. Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor beta1 deficiency : medical and immunological implications. *J Exp Med* 2003 ; 197 : 527-35.
14. Feinberg J, Fieschi C, Doffinger R, et al. Bacillus Calmette Guérin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2004 ; 34 : 3276-84.
15. Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 2003 ; 72 : 643-91.
16. Vogt G, Chappier A, Yang K, et al. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 692-700.

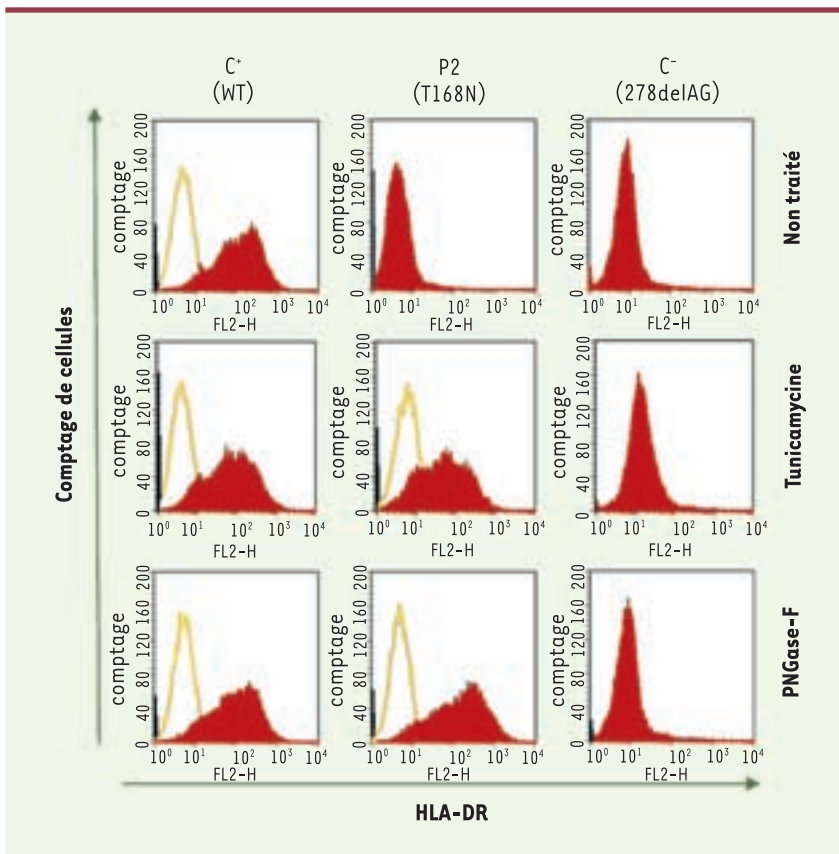


Figure 1. Complémentation chimique du phénotype cellulaire. Des fibroblastes transformés par l'antigène T SV40 d'un contrôle positif (C⁺) d'un des patients portant la mutation T168N (P2) et d'un contrôle négatif portant l'allèle 278delAG IFNGR2 (C⁻) [5] ont été incubés 48 heures dans un milieu de culture complet avec (histogramme rouge) ou sans (histogramme jaune) IFN γ (10^5 IU.mL⁻¹), tunicamycine ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ou PNGase-F (750 IU.mL^{-1}). L'expression de surface des molécules HLA-DR a été déterminée par la technique de cytométrie en flux en utilisant un anticorps spécifique directement couplé à un fluorochrome (adapté de [16]).