

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2005

N°52

THESE
Pour le
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en : Biologie Médicale

par

Sébastien SCHMITT

Né le 21 Mars 1977 à Nice (06)

Présentée et soutenue publiquement le 21 Décembre 2005

**Recherche de nouvelles bases moléculaires
responsables de l'acrodermatite entéropathique**

Président : Madame le Professeur B. Dreno

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur S. Bezieau

TABLES DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	p 12
-----------------------------	-------------

II. GENERALITES.....	p 15
-----------------------------	-------------

II-1. L'atome de zinc

II-1.1. Propriétés

II-1.2. Sources et besoins en zinc

II-1.3. Répartition du zinc dans l'organisme

II-1.4. Absorption du zinc

II-1.5. Excrétion du zinc

II-1.6. Toxicité du zinc

II-2. Rôles métaboliques et physiologiques du zinc

II-2.1. Rôles métaboliques du zinc

II-2.1.1. Enzymes à zinc

II-2.1.2. Protéines à zinc non enzymatiques

II-2.1.2.1. Les métallothionéines

II-2.1.2.2. Protéines régulatrices de gènes

II-2.2. Rôles physiologiques du zinc

III-2.2.1. Zinc et système nerveux central

III-2.2.2. Zinc et système oculaire

III-2.2.3. Zinc et système reproducteur

III-2.2.4. Zinc et système endocrine

III-2.2.5. Zinc et système immunitaire

III-2.2.6. Zinc et appareil cutané

II-3. Transport du zinc chez les mammifères

II-3.1. Gène / Protéine *DCT1*

II-3.2. Transporteurs de zinc de type SLC (Solute Carrier Family)

II-3.2.1. Gènes *hSLC30A*-Protéines *ZnT*

II-3.2.2. Gènes *hSLC39A*-Protéines ZiP

II-4. L'acrodermatite entéropathique

II-4.1. Introduction

II-4.2. Clinique

II-4.3. Physiopathologie

II-4.4. Identification du gène *hSLC39A4*

II-4.5. Spectre des mutations du gène *hSLC39A4*

OBJECTIF DE L'ETUDE

III. MATERIEL ET METHODES.....p 52

III-1. Recueil des familles

III-2. Extraction et dosage de l'ADN

III-3. Technique QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) appliquée au gène *hSLC39A4*

III-4. Etude d'expression des différents gènes du transport de zinc

III-5. Séquençage des gènes candidats *hSLC39A1*, *hSLC39A5* et *DCT1*

III-5.1. Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *hSLC39A5*

III-5.1.1. Mélange réactionnel utilisé

III-5.1.2. Conditions d'amplification PCR

III-5.2. Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *hSLC39A1*

III-5.2.1. Mélange réactionnel utilisé

III-5.2.2. Conditions d'amplification PCR

III-5.3. Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *DCT1*

III-5.3.1. Mélange réactionnel utilisé

IV. RESULTATS.....p 68

IV-1. Analyse par QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) du gène *hSLC39A4*

IV-2. Etude d'expression des différents gènes du transport de zinc

IV-3. Analyse mutationnelle du gène *hSLC39A5*

IV-4. Analyse mutationnelle du gène *hSLC39A1*

IV-5. Analyse mutationnelle du gène *DCT1*

V. DISCUSSION.....p 77

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVESp 83

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

Index des figures, schémas et tableaux

Figure 1 : Lésions de la région péri-orificielle

Figure 2 : Plaques érythémateuses faciales

Figure 3 : Profil normal de la PCR multiplexe 1 : patient non délété

Figure 4 : c.1223_1227delCCGGG en rouge à l'état hétérozygote dans l'exon 7 : patient 7

Figure 5 : c.1223_1227delCCGGG à l'état homozygote (patient hors inclusion)

Figure 6 : Profil normal de la PCR multiplexe 4 : patient non délété

Figure 7 : c.763delC en rouge à l'état hétérozygote dans l'exon 4 : patient 11

Figure 8 : Profil normal du fragment 5UTR-2 du promoteur : patient non délété

Figure 9 : Délétion en rouge du fragment 5UTR-2 du promoteur : patients 4 et 5

Figure 10 : Profil normal du fragment 5UTR-1 du promoteur : patient non délété

Figure 11 : Délétion en rouge du fragment 5UTR-1 du promoteur : patients 4 et 5

Figure 12 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A1*

Figure 13 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A7*

Figure 14 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A9*

Figure 15 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression du gène *hSLC39A13*

Schéma 1 : Représentation schématique de la structure d'une métallothionéine

Schéma 2 : Représentation d'un domaine en doigts de zinc

Schéma 3 : Topologie du transporteur membranaire *DCT1*

Schéma 4 : Topologie des transporteurs membranaires ZnT

Schéma 5 : Topologie des transporteurs membranaires ZiP

Schéma 6 : Représentation schématique du gène *hSLC39A4*

Tableau 1 : Apports recommandés en zinc (mg/j)

Tableau 2 : Gènes de la famille *hSLC30A*

Tableau 3 : Gènes de la famille *hSLC39A*

Tableau 4 : Base de données des mutations de *hSLC39A4*

Tableau 5 : Patients atteints d'AE et inclus dans cette étude

Tableau 6 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 3, 7, 10 et 2 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 7 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 8, 5 et 11 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 8 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 6, 12, 9 et 1 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 9 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de l'exon 4 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 10 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-4 et 5UTR-3 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 11 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-5 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 12 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-2 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 13 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-1 de *hSLC39A4* par QM-PSF

Tableau 14 : Mélange réactionnel utilisé pour les différentes PCR d'expression tissulaire

Tableau 15 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR du gène *hSLC39A5*

Tableau 16 : Conditions d'amplifications PCR du gène *hSLC39A5*

Tableau 17 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR du gène *hSLC39A1*

Tableau 18 : Conditions d'amplifications PCR du gène *hSLC39A1*

Tableau 19 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR du gène *DCT1*

Tableau 20 : Conditions d'amplifications PCR du gène *DCT1*

Tableau 21 : Expression tissulaire des gènes *hSLC30A6*, 7, 8 et 9 (Panel II Clontech™)

Tableau 22 : Expression tissulaire des gènes *hSLC39A1*, 6, 7, 9, 11, 13 et 14

Table des annexes

Tableau 23 : Séquences des amorces utilisées en QMPSF et tailles des produits d'amplification

Tableau 24 : Séquences des amorces et conditions d'amplifications pour les gènes transporteurs de zinc

Tableau 25 : Amorces de séquençage du gène *hSLC39A5*

Tableau 26 : Amorces de séquençage du gène *hSLC39A1*

Tableau 27 : Amorces de séquençage du gène *DCT1*

Liste des abréviations

AE	: acrodermatite entéropathique
AJR	: apport journalier recommandé
ANR	: apports nutritionnels recommandés
ARNm	: acide ribonucléique messager
ATP	: adenosine triphosphate
BHK	: cellule baby hamster kidney
CDF	: cation diffusion facilitator
cDNA	: acide désoxyribonucléique complémentaire
cm	: centiMorgan
CMH	: complexe majeur d'histo-compatibilité
dNTP	: désoxynucléotide
ddNTP	: didéoxynucléotide
DMLA	: dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO	: diméthyl sulfoxyde
DMT1	: divalent metal transporter1
EGF	: epithelium growth factor
EST	: expressed sequence tag
GABA	: acide gamma-aminobutyrique
GH	: hormone de croissance
HSP	: heat shock protein
IGF-1	: insulin-like growth factor I
K.O	: knock-out
KDa	: kilo-Dalton
Lm	: lethal milk
LPS	: lipopolysaccharide
mg/j	: milligramme/ jour
NK	: cellule tueuse naturelle
Nramp2	: natural resistance-associated macrophage protein-2
QM-PSF	: Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments
SLC30	: Solute Carrier Family 30
SLC39	: Solute Carrier Family 39
SOD	: superoxyde dismutase
Tat	: transactivating protein
TNF	: tumor necrosis factor
VIH	: virus d'immunodéficience acquise
ZiP	: zinc iron-regulated transporter-like protein
Zn	: zinc
ZnT	: zinc transporter
8q	: bras long du chromosome 8

I. INTRODUCTION

L'acrodermatite entéropathique (AE) est une pathologie d'origine héréditaire ou acquise. La forme héréditaire, de transmission autosomique récessive, apparaît à la naissance ou au sevrage. Elle est extrêmement rare et se traduit par une déficience généralisée en zinc (MIM 201100) [1, 2]. Décrite initialement en 1936 par Brandt, l'AE fut unifiée au niveau clinique en 1942 par Danbolt et Closs. C'est un déficit d'absorption du zinc par les muqueuses duodénales et jéjunales qui est à l'origine de l'hypozincémie.

Cette carence est extrêmement délétère pour l'organisme. En effet, le métal, associé à certaines protéines est indispensable au fonctionnement de nombreuses voies métaboliques ainsi qu'au contrôle de la transcription des gènes.

Au niveau clinique, la déplétion en zinc est caractérisée par une triade de symptômes comprenant une dermatite acrale et péri-orificielle, une alopécie généralisée et des diarrhées. D'autres troubles plus inconstants peuvent également être observés telles qu'un retard de croissance, un hypogonadisme, des atteintes ophtalmologiques ou neuropsychiatriques [1, 3]. La fonction immune peut s'altérer, augmentant par là même la sensibilité aux infections et conduisant éventuellement à un syndrome de déficience immunitaire généralisé pouvant se compliquer d'une défaillance multi-viscérale fatale. Toutefois, cette issue n'est pas inéluctable, puisque les patients présentant une déplétion profonde peuvent être traités par une supplémentation quotidienne et à vie en gluconate de zinc par voie orale. Ce traitement très efficace permet une rémission spectaculaire de tous les signes cliniques en quelques jours.

Les connaissances sur la physiopathologie de l'AE se sont progressivement étendues. Le déficit d'absorption du zinc est démontré depuis de nombreuses années. En effet, des expériences utilisant des isotopes radioactifs ^{65}Zn et $^{69\text{m}}\text{Zn}$ ont révélé un déficit d'absorption du zinc par les muqueuses duodénales [2, 4] et jéjunales [5]. Ces observations ont permis de comprendre, entre autres, l'effondrement des taux plasmatiques de zinc chez les patients présentant une AE. Différentes équipes se sont alors orientées vers des protéines membranaires spécifiques du transport du zinc pour expliquer ce défaut d'absorption. Ainsi, le *lethal milk* (lm), affection métabolique du zinc chez la souris, équivalent clinique de l'AE humaine a été attribué à l'altération d'une protéine (mZnT4) codée par un gène transporteur du métal, *SLC30A4* [6]. Par homologie avec la souris, différents gènes humains de la famille *hSLC30*, dont *hSLC30A4*, ont été étudiés pour démontrer leurs implications dans la pathogénie de l'AE mais ces recherches se sont révélées infructueuses [7].

Ce n'est qu'en 2002 que les bases moléculaires de l'AE ont été élucidées [8, 9]. C'est une technique de cartographie d'homozygotie dans une famille consanguine originaire du Moyen-Orient qui a permis de localiser le locus de l'AE dans une région d'environ 3.5

centiMorgan (cM) sur le chromosome 8 en 8q24 [9]. Le gène candidat localisé dans cette région, *hSLC39A4* (pour Solute Carrier Family 39, membre 4) code pour une protéine, hZiP4, qui présente des similitudes avec les autres membres de la famille ZiP (zinc iron-regulated transporter-like protein). Elle est impliquée dans l'assimilation du zinc chez *Arabidopsis thaliana* et chez l'homme [8]. Le gène *hSLC39A4* contient 12 exons et s'étend sur 4.7 kilobases. Il est exprimé abondamment sur la membrane apicale entérocytaire au niveau du duodénum et du jéjunum [8, 9]. Depuis la description *princeps*, différentes mutations ont été décrites. La parfaite co-ségrégation entre ces mutations et le phénotype clinique d'AE retrouvé chez ces patients sont de forts arguments en faveur de l'implication du gène dans l'AE. Cependant, après séquençage du gène *hSLC39A4*, l'absence ou la présence à l'état hétérozygote d'une mutation pour un certain nombre de patients tend à prouver l'existence d'un autre mécanisme moléculaire dans cette pathologie.

Le but de cette thèse était d'abord d'étudier la présence de grands réarrangements (délétions, duplications) qui ne sont pas visibles après séquençage classique du gène. Nous avons donc adapté une technique de PCR semi quantitative de développement récent: la QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) [10] qui présente l'avantage de mettre en évidence ces anomalies moléculaires. Nous avons mené en parallèle une étude d'expression sur l'ensemble des gènes codant pour des protéines transportrices du zinc (familles des gènes *hSLC30* et *hSLC39*). Avec l'aboutissement du Projet Génome Humain, les familles de gènes impliquées dans la physiologie du zinc se sont sensiblement élargies. A titre d'exemple, on recense quatorze gènes *hSLC39A* humains en 2005, qui sont autant de candidats susceptibles d'être impliqués dans d'autres formes d'AE non liées à *hSLC39A4*. Après détermination de l'expression tissulaire de chacun de ces gènes et confrontation avec les différentes données bibliographiques existantes, nous n'avons sélectionné pour le séquençage que les gènes à expression majoritairement intestinale. Cette approche « gène candidat » que nous avons mené en parallèle, semblait être la plus adaptée à notre recherche. En effet, bien que pour étudier un deuxième mécanisme moléculaire impliqué dans l'AE, la réalisation d'une cartographie par homozygotie eût été plus séduisante, elle présentait un obstacle majeur pour ce travail. En effet, l'inclusion de familles complètes pour mener à bien cette approche n'a pu être réalisée au cours de cette thèse..

Au total, le cumul des informations recueillies dans ce projet a eu pour finalité de préciser, dans la mesure du possible, la physiopathologie de l'AE et d'améliorer le diagnostic moléculaire de cette pathologie.

II. GENERALITES

II-1. L'atome de zinc

II-1.1. Propriétés

Le zinc appartient, dans la classification de Mendeleïev, au groupe des métaux de transition, constituants indispensables des organismes vivants. Ce groupe de 30 éléments chimiques est réparti sur les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} périodes du tableau. Le zinc se range parmi les éléments de transition de première série, dans le groupe IIb qui comprend également le cadmium et le mercure. Il possède exclusivement le degré d'oxydation 2 et présente une grande affinité pour les atomes de soufre, d'oxygène et d'azote auxquels il se lie facilement. Le potentiel chimique et la réactivité de ce métal ne sont pas exceptionnels comparés aux autres métaux. Cependant, contrairement aux autres métaux de transition de premier groupe (Sc^{2+} , Ti^{2+} , V^{2+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} et Cu^{2+}), l'ion Zn^{2+} contient une orbitale *d* complète (d^{10}), ce qui fait qu'il ne participe pas aux réactions redox. En raison de sa faible activité redox, le Zn^{2+} est un ion stable dans les milieux biologiques. Il est ainsi un excellent cofacteur pour des réactions nécessitant un potentiel redox stable comme les catalyseurs de type acide de Lewis. Le caractère amphotère des complexes aqua-zinc et hydroxo-zinc, qui caractérise le zinc à des valeurs de pH proches de la neutralité, rend ce métal particulièrement adapté aux milieux biologiques. L'ion Zn^{2+} forme des orbitales d'hybridation avec des atomes ou autres ligands chargés négativement comme les groupes thiols, amines ou imidazoles des acides aminés ou des protéines. Dans les systèmes biologiques, le zinc n'existe pratiquement pas sous forme libre mais est retrouvé sous forme de cation divalent lié à une molécule complexante, enzyme ou autre protéine. Il existe une grande variété de géométries de coordination du zinc allant de tétraédrique normale ou déformée, bipyramidale à base trigonale, pyramidale à base carrée, à octaédrique. Ces multiples géométries de coordination contribuent à sa versatilité biochimique et à l'étendue de son rôle métabolique [11].

II-1.2. Sources et besoins en zinc

Le zinc est un oligo-élément essentiel dans l'ensemble du monde biologique (micro-organismes, végétaux, mammifères...). Ce métal est omniprésent dans l'alimentation, où on le trouve en majeure partie lié aux protéines. Le zinc est abondant dans la plupart des viandes, notamment rouges, dans certains fruits de mer, en particulier les huîtres et est présent en quantité appréciable dans les légumineuses et les céréales. Chez l'adulte, l'apport quotidien recommandé est d'environ 8mg/jour pour une femme et de 11mg/jour pour un homme [12].

Les besoins en zinc dépendent du statut physiologique de l'individu. Etant donné le rôle du zinc dans les synthèses protéiques, il paraît logique que des événements caractérisés par une forte activité métabolique, comme la croissance, la gestation ou la lactation, nécessitent des quantités accrues de zinc. Ainsi, pendant la grossesse un besoin supplémentaire total d'environ 1540 μmol , soit environ 100 mg est nécessaire. Cette quantité correspond grossièrement à 5% du poids total en zinc chez la femme non enceinte. Pendant la seconde partie de la grossesse, les besoins journaliers additionnels en zinc sont en moyenne de 0.6 mg/jour, soit un besoin total journalier d'environ 2.6 mg, 2mg/jour étant nécessaire au sujet normal pour compenser les pertes endogènes et maintenir un équilibre en zinc. Ce besoin supplémentaire peut être couvert soit par une augmentation des apports exogènes, soit par une adaptation de l'homéostasie du zinc en cas d'apports insuffisants et, dans une certaine limite, en diminuant les pertes. Selon plusieurs études, la femme enceinte n'augmenterait pas ses apports et maintiendrait son apport journalier entre 8 et 10 mg alors que les recommandations sont de 13 mg. L'ajustement homéostatique joue alors un rôle prépondérant. On constate un ajustement de la fraction absorbée du zinc, qui augmente d'environ 30% en fin de grossesse par rapport au stade préconceptionnel et peut aller jusqu'à 80% pendant l'allaitement. Ces données confirment le rôle d'adaptation des capacités d'absorption intestinale du zinc dans le maintien de l'homéostasie du zinc. A l'opposé, la réduction de l'excrétion gastro-intestinale et rénale semble être moins impliquée dans cette régulation [13].

Les besoins varient aussi avec l'âge : les jeunes enfants, les adolescentes et les adultes plus âgés sont particulièrement vulnérables à une légère carence en zinc. Les habitudes alimentaires peuvent également faire varier les besoins en zinc. Par exemple, un végétarien qui consomme habituellement moins d'aliments riches en zinc, comme la viande, les poissons et fruits de mer, peut nécessiter jusqu'à 50% de zinc en plus.

Age	Apport nutritionnel recommandé en zinc
De 7 mois à 3 ans	3 mg/ jour
De 4 ans à 8 ans	5 mg/ jour
De 9 ans à 13 ans	8 mg/ jour
De 14 à 18 ans	11 mg (garçons)/ 9 mg (filles)/ jour
19 ans et plus	11mg (hommes)/ 8mg (femmes)/ jour
Femmes enceintes	13 mg/ jour
Femmes qui allaitent	14 mg/ jour

Tableau 1 : Apports recommandés en zinc (mg/j)

Ces données sont le résultat d'un consensus entre les autorités canadiennes et américaines qui ont entrepris une démarche d'uniformisation des apports nutritionnels recommandés (ANR). L'apport journalier recommandé (AJR) correspond au niveau de consommation nécessaire et suffisant pour pratiquement chaque individu en bonne santé.

II-1.3. Répartition du zinc dans l'organisme

Chez l'homme, le zinc est le 2ème oligo-élément par ordre de fréquence derrière le fer. Un adulte d'un poids moyen de 70 kg en contient entre 2 et 3 grammes [11]. Il est présent dans tous les tissus et les liquides de l'organisme. Sa concentration dans la masse maigre de l'organisme est d'environ 30 µg/g. Les muscles squelettiques contiennent environ 60% de la teneur totale, et l'os, avec une concentration d'environ 100-200 µg/g, en contient approximativement 30%. Le zinc est également présent dans la prostate, la rétine, le foie, la peau et les phanères. C'est justement la prostate, les cheveux et les yeux qui sont proportionnellement les tissus les plus riches en zinc [14]. Les concentrations sont élevées dans la choroïde de l'œil (274 µg/g) et dans les sécrétions prostatiques (300-500 µg/ml) [15]. Dans la peau, le zinc n'est présent qu'à une très faible concentration. Mais, il est réparti de façon hétérogène car si le derme en est pratiquement dépourvu, le stratum germinatif en est beaucoup plus riche.

Mises à part les sécrétions prostatiques, les liquides de l'organisme ne représentent qu'une faible part du zinc total. La très grosse majorité du zinc de l'organisme, soit environ 99% du zinc total, est intracellulaire. Ainsi, le pool plasmatique ne représente qu'environ 0.1% de la teneur totale du métal avec une concentration de 1 µg/L soit environ 12% du zinc sanguin. La concentration plasmatique est régulée finement afin de maintenir l'homéostasie du métal. En fait, le zinc est principalement retrouvé dans les éléments figurés. Dans les hématies, le métal se fixe fortement à l'anhydrase carbonique avec une concentration comprise entre 12 et 15 µg/l soit environ 80 % du zinc sanguin. Dans les leucocytes et les plaquettes, le métal est présent en proportion moindre. C'est pourquoi, bien que le dosage du zinc plasmatique soit plus aisé, le dosage sur sang total est souvent plus informatif sur le stock en zinc de l'organisme. En effet, le zinc plasmatique subit de nombreuses variations liées au rythme nyctéméral, au stress, aux infections, au jeûne, à l'âge, au sexe voir aux taux de protéines plasmatiques.

Le zinc absorbé est transporté de façon active au niveau du plasma. Il est en majorité complexé à des ligands organiques tels que l'albumine (entre 60% et 80% selon les publications). Sous cette forme, le zinc est facilement échangeable et peut se lier à différentes protéines tissulaires dont les métallothionéines dans le foie et les reins. Une plus faible partie du zinc circulant est piégé au niveau de l' α_2 -macroglobuline (entre 17 et 40% selon les publications) mais ce complexe ne peut se dissocier qu'au niveau du foie. Une troisième fraction ultra-filtrable (2 à 3%), incluant notamment la transferrine, la transthyrétine ou certains acides aminés comme l'histidine et la cystéine peut également servir dans le transport de l'oligo-élément. Enfin, une faible proportion seulement du zinc plasmatique existe sous forme ionique.

II-1.4. Absorption du zinc

L'absorption du zinc est dépendante de sa concentration et prend place tout le long de l'intestin grêle [16]. Le jéjunum apparaît comme le site d'absorption maximum, le colon ne jouant qu'un rôle mineur [17]. Des études isotopiques d'absorption du zinc ont mis en évidence que l'absorption s'approche de la saturation si l'apport excède chez l'adulte 4 ou 5 mg par repas. Il existe une grande différence entre l'absorption du zinc en solution aqueuse, qui chez un individu à jeun peut atteindre 60-70%, et l'absorption à partir de régimes solides, qui est beaucoup moins efficace. Le métal pénètre ensuite à l'intérieur des entérocytes au niveau de la bordure en brosse grâce à des protéines spécifiques du transport du zinc. L'étude de l'ensemble de ces transporteurs fera l'objet d'un chapitre détaillé. Au niveau intracellulaire, le métal peut alors se fixer à des méthallothionéines. Ces protéines de nature non-enzymatique sont des dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre, la thionéine [18]. Ce sont les changements de l'état redox de l'environnement cellulaire qui déterminent la distribution du zinc avec ces molécules. Cette propriété de fixation temporaire du zinc suggère une position clé des métallothionéines dans la physiologie du zinc et, plus particulièrement, dans l'homéostasie et dans la distribution du métal au sein de la cellule.

De nombreux facteurs alimentaires ont été identifiés comme promoteurs ou antagonistes de l'absorption du zinc. Des substances organiques solubles, de faible poids moléculaire, tels que de nombreux acides aminés fixent le zinc et facilitent son absorption. A l'inverse, des composés organiques qui forment avec le zinc des complexes stables, faiblement solubles, peuvent la réduire. Enfin, des interactions compétitives entre le zinc et d'autres ions en excès possédant des propriétés physico-chimiques semblables, comme le

cadmium, peuvent diminuer la fixation et le transport intestinal du zinc et, par la suite son absorption. Les études isotopiques menées sur l'homme ont permis d'identifier quatre facteurs principaux qui influencent l'absorption et l'utilisation du zinc. Il s'agit de la teneur en phytates (hexophosphates et pentaphosphates inositol), l'âge de l'individu, la source de protéines et la teneur totale en zinc du régime.

Un effet inhibiteur des phytates sur l'utilisation du zinc a d'abord été identifié chez l'animal. Aux valeurs de pH rencontrées dans les aliments, les phytates sont porteur d'une forte charge négative et présentent ainsi un fort potentiel de fixation de cations divalents tels que le zinc. Un effet dépressif des phytates sur l'absorption du zinc a ensuite été montré chez l'homme [19]. Sa présence dans le pain complet et dans les aliments à base de protéines de soja est la raison la plus probable de la faible absorption fractionnelle du zinc (<20%) à partir de ces aliments. Dans un régime complexe, l'effet des phytates sur l'absorption du zinc dépend cependant de la composition de l'ensemble du régime. Les protéines animales, par exemple la viande rouge maigre ou le lait maternel humain, améliorent l'absorption du zinc à partir d'un régime contenant des phytates. Par contre, le rôle du calcium comme potentialisateur des phytates est remis en question depuis quelques années. L'effet dépressif des phytates sur le zinc semble plus prononcé dans les régimes à base de céréales complètes, et dans les légumineuses qui en sont particulièrement riches [20].

Dans des régimes à faible teneur en zinc, l'absorption fractionnelle peut atteindre 40-60%, alors que dans des régimes en contenant davantage, elle est normalement de 20-30%.

Enfin, l'absorption du zinc dépend de l'âge de l'individu et de la source des protéines. Par exemple, les nourrissons absorbent probablement jusqu'à 80% du zinc du lait maternel, alors que les adultes ne sont capables d'en absorber que 40 % environ. La source des protéines fait varier également l'absorption, puisque, bien qu'un adulte soit capable d'absorber environ 40% du lait maternel, il ne pourra absorber que 30% d'une alimentation à base de lait de vache et 15% d'une alimentation à base de soja [21].

II-1.5. Excrétion du zinc

Le zinc est éliminé de l'organisme par les reins, la peau et l'intestin. Les pertes fécales sont estimées en moyenne à environ 0.5 mg/jour et varient en fonction des quantités de zinc ingérées puis absorbées par l'intestin, et des besoins physiologiques de l'individu [20]. Au total, l'élimination est essentiellement fécale (70-80 %). Elle est facilitée par les sécrétions biliaires et pancréatiques qui sont particulièrement riches en zinc.

Entre 15 et 25 % du zinc est éliminé dans les urines, la sueur, la salive et les cheveux. Les concentrations urinaires de zinc subissent des variations diurnes et sont augmentées dans certaines pathologies (cirrhose, syndrome néphrotique) et en cas de malnutrition ou de carence, en raison d'un catabolisme tissulaire accru. La voie d'élimination du zinc inhalé est peu connue même si l'on sait qu'au moins une partie est éliminée via les urines.

II-1.6. Toxicité du zinc

Selon les données limitées dont on dispose chez l'homme, des troubles fonctionnels ou décelables cliniquement peuvent apparaître pour un apport moyen de zinc supérieur à 150 mg/jour. Le zinc présente une toxicité qui s'exprime pour des doses plus importantes par rapport aux autres métaux. Les manifestations dépendent de la forme chimique, de la voie d'administration et de l'importance de la dose. Peu de cas d'empoisonnements aigus par le zinc sont rapportés dans la littérature. Les symptômes de l'intoxication aiguë au zinc par ingestion sont surtout gastro-intestinaux, incluant nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhées, hématuries. Ces signes cliniques aspécifiques peuvent être parfois associés à de la fièvre et à une léthargie qui sont toujours réversibles après une prise en charge adaptée.

Par inhalation, la plupart des sels de zinc, notamment le chlorure de zinc, irritent les muqueuses des voies respiratoires. Les symptômes cliniques peuvent aller d'une simple toux à un syndrome de détresse respiratoire aigu, avec un œdème pulmonaire lésionnel. Les décès parmi les personnes exposées à des concentrations élevées de chlorure de zinc surviennent parfois dans les heures suivant le contact voire de manière beaucoup plus tardive, dans le cas où le patient développerait une fibrose pulmonaire avec une insuffisance respiratoire chronique.

En raison de son action caustique, le chlorure de zinc peut causer des ulcérations et une dermatite localisée. Le chlorure et le sulfate de zinc peuvent causer également des dommages

ophtalmologiques significatifs. Rougeur et inconfort persistant apparaissent après exposition à des solutions concentrées de l'un de ces sels. Dans les 6 jours, une opacité discrète du stroma de la cornée peut se développer, avec irrégularité de l'épithélium sus-jacent. A terme, une cataracte, un iritis ou un glaucome peuvent apparaître après projection oculaire d'une solution concentrée de chlorure de zinc.

En milieu professionnel, certaines opérations très spécifiques se déroulant à hautes températures, comme le découpage ou la soudure d'acier galvanisé, peuvent conduire à la formation de fumées contenant des particules ultrafines d'oxyde de zinc. L'exposition à ces fumées peut causer ce qu'on appelle la « fièvre des fondeurs » [14]. Débutant 4 à 12 heures après l'exposition, les symptômes peuvent durer de quelques heures à quelques jours et sont caractérisés par une dysgueusie (goût métallique), une toux sèche, une dyspnée et syndrome grippal. Au niveau biologique, on retrouve à la numération formule sanguine une hyperleucocytose significative. On n'a observé aucune séquelles à long terme.

Par ailleurs, on a montré qu'une exposition de longue durée à des apports de zinc nettement supérieurs aux besoins aboutit à une interférence avec le métabolisme d'autres oligo-éléments. L'utilisation du cuivre est particulièrement sensible à un excès de zinc. Cette interaction cuivre/zinc est rendu responsable de l'induction par inadvertance d'une carence en cuivre, mais a aussi été exploitée pour combattre l'accumulation de cuivre dans la maladie de Wilson [20]. En contrepartie, l'ingestion chronique de doses élevées de suppléments diététiques de zinc provoque une anémie sidérolastique et une leucopénie induite par la carence en cuivre.

Le zinc semble ne pas être tératogène. Le chromate de zinc, dont le caractère carcinogène a été confirmé chez l'homme, est dû à la présence de chrome hexavalent et non du zinc. Au total, il n'y a aucune preuve de la cancérogénicité intrinsèque du zinc chez l'homme.

II-2. Rôles métaboliques et physiologiques du zinc

II-2.1. Rôles métaboliques du zinc

Les fonctions biologiques du zinc peuvent être divisées en trois catégories distinctes : une fonction catalytique, une intervention dans la structure de certaines protéines et un rôle dans la régulation du métabolisme cellulaire.

II-2.1.1. Enzymes à zinc

Le zinc peut revêtir de manière équivalente une multiplicité de géométries de coordination, qui ne sont séparées par aucune barrière énergétique [11]. Cette particularité est mise à profit par les enzymes qui utilisent le métal pour catalyser des transformations chimiques. Le Zn^{2+} est également un excellent cofacteur car ses liaisons de coordination avec les ligands, bien que stables, peuvent se rompre facilement. Les complexes à zinc se dissocient facilement et le métal peut ainsi être rendu facilement à d'autres ligands. Il en découle un renouvellement rapide du pool de zinc disponible, chaque atome de zinc pouvant être utilisé par une multiplicité de ligands. Selon le site de fixation dans la métalloenzyme, le zinc peut jouer un rôle catalytique, co-catalytique ou structural. A ce jour, on connaît plus de 300 enzymes spécifiques qui dépendent du zinc pour leur activité catalytique (ex : alcool déshydrogénase, anhydrase carbonique). La perte du métal entraîne une baisse d'activité enzymatique, tandis que son apport la restaure. L'ensemble des six classes d'enzymes contient des métallo-enzymes à zinc. L'ion zinc, dit catalytique, se fixe à l'intérieur même du site actif où il intervient, directement dans l'activité catalytique, en participant soit à la liaison au substrat, soit à la transformation du substrat [22].

Le zinc peut également jouer un rôle structural pour certaines enzymes comme la superoxyde dismutase cuivre-zinc, pour laquelle le cuivre joue le rôle catalytique, tandis que le zinc entre en compte dans la structure protéique. Par l'intermédiaire de son groupement thiol, la cystéine est de loin le ligand le plus fréquemment associé au zinc dans le site structural. La grande stabilité de ces complexes à zinc assure une stabilisation des structures protéiques locales et générales similaires à celle apportée par les ponts disulfures.

II-2.1.2. Protéines à zinc non enzymatiques

II-2.1.2.1. Les métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines de nature non enzymatique, dérivées métalliques d'une protéine riche en soufre, la thionéine [18]. Elles ont été mises en évidence non seulement chez les vertébrés, mais également chez des invertébrés, des plantes et des micro-organismes. Ce sont des protéines ubiquitaires, qui atteignent des concentrations maximales dans des organes tels que le foie, les reins, l'intestin grêle et le pancréas [18]. Ces molécules de faible poids moléculaire sont exceptionnellement riches en zinc (sept atomes de

zinc par protéine) et en cystéines. L'analyse structurale d'une métallothionéine révèle une structure en haltère, dans laquelle chaque atome de zinc se retrouve tétracoordonné à quatre cystéines sous forme redox inerte, protégée efficacement contre l'environnement par la protéine qui l'enveloppe (Cf. Schéma 1).

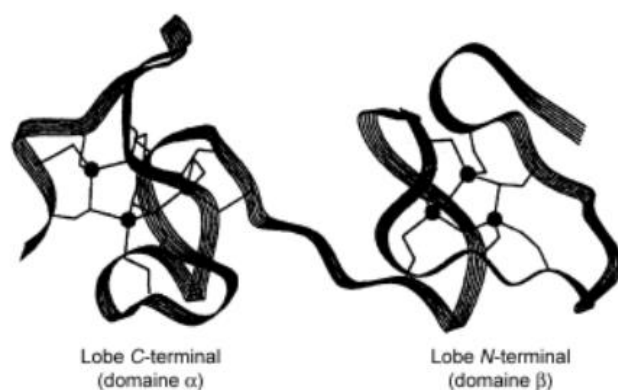


Schéma 1 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'une métallothionéine.

(image disponible sur le site Web : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-ToxicologiePbEau.html>)

Etant donné que la structure protéique et la coordination tétraédrique du zinc empêchent l'accès d'autres ligands au zinc, il semblerait qu'un changement conformationnel soit nécessaire à la libération du métal. Les deux réseaux zinc-thiolates en amas se comportent comme des unités redox qui procurent une certaine labilité au zinc. Le potentiel de ces unités est si bas qu'il entraîne la rupture des liens du zinc avec la métallothionéine [23]. Le zinc libéré peut alors se fixer aux apoformes d'enzymes de bien moindre affinité pour lui que la métallothionéine, mais qui requièrent néanmoins sa présence en tant que cofacteur ou élément structural (Cf. II-2.1.1.). En conséquence, ce sont les changements de l'état redox de l'environnement cellulaire qui déterminent la distribution du zinc entre molécules, puisque des conditions cellulaires plutôt oxydantes libèrent le zinc des métallothionéines, tandis que des conditions réductrices conduisent au contraire à sa fixation [23]. Cette propriété de fixation temporaire du zinc suggère une position clé des métallothionéines dans la physiologie du zinc et, plus particulièrement, dans l'homéostasie et la distribution du métal au sein de la cellule.

II-2.1.2.2. Protéines régulatrices de gènes

Le zinc peut jouer un rôle important dans l'activité des protéines régulatrices de gènes en leur assurant une conformation fonctionnelle. Les domaines en doigts de zinc, classés dans le type Cys₂His₂, sont définis de façon caractéristique par une séquence de vingt-cinq à trente acides aminés, dont les deux résidus cystéines et les deux résidus histidines conservés forment les quatre ligands de coordination d'un atome de zinc structural unique [24]. En règle générale, chaque unité Cys₂His₂ est définie par sa séquence primaire, calquée sur un motif consensus [22]. Le site de fixation à l'ADN proprement dit se localise, quant à lui, dans la boucle formée entre deux paires successives de ligands cystéines et histidines d'un atome de zinc. Seule une partie de cette boucle à l'origine du terme « motif en doigt de zinc », interagit généralement avec quatre à cinq nucléotides de la séquence ADN cible.

Les protéines à zinc impliquées dans le contrôle de la réplication et/ou de la transcription de l'ADN sont très conservées dans l'évolution phylogénétique et se retrouvent aussi bien sur des facteurs de transcription (type GAL4 par exemple) que sur des récepteurs nucléaires d'hormones stéroïdiennes ou thyroïdiennes.

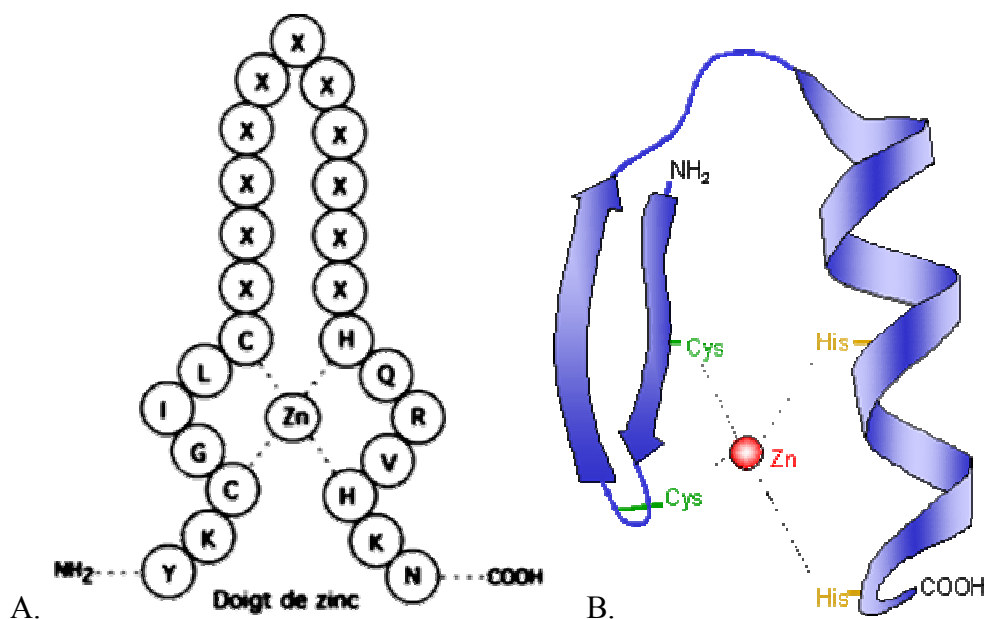


Schéma 2 : A. Représentation d'un domaine en doigt de zinc

B . Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un domaine en doigt de zinc.
(image disponible sur le site Web : http://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger

II-2.2. Rôles physiologiques du zinc

III-2.2.1. Zinc et système nerveux central

Dans le système nerveux central des mammifères, le zinc est distribué de façon hétérogène. Les quantités les plus abondantes se situent dans l'hippocampe et dans le néocortex cérébral [14]. Grâce à ses connections limbiques, l'hippocampe est capable d'influencer de nombreuses activités cérébrales et, par conséquent, la déplétion en métal dans cette zone pourrait contribuer à une grande variété de pathologies cérébrales. En dehors de l'hippocampe et du néocortex, on retrouve dans l'amygdale, la matière grise, la substance noire, le noyau lentiforme et le thalamus des quantités appréciables de zinc. Au sein de ces tissus riches en zinc, une fraction substantielle du zinc (10-15%) se localise dans les vésicules pré-synaptiques d'un sous-groupe de neurones glutamatergiques, dits « neurones à zinc » [25]. Une quantité bien moindre du zinc neuronal est faiblement liée à des protéines ou des acides aminés cytoplasmiques. L'ensemble zinc vésiculaire et cytoplasmique constitue la fraction chélatable ou dialysable ; ce sont en fait les seules formes histochimiquement réactives du zinc dans les cellules nerveuses [14]. Le reste du zinc neuronal est comparable à celui que l'on peut trouver dans l'ensemble de l'organisme, lié de façon étroite à des protéines (enzymes, métallothionéines,...). Cette fraction majoritaire de zinc (jusqu'à 90%) agit comme composant structural ou comme catalyseur enzymatique [26]. Dans les neurones glutamatergiques, le zinc pourrait moduler la réponse de récepteurs de neurotransmetteurs comme l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) [27]. Plusieurs molécules semblent influencer sur le rôle neuromodulateur du zinc dont la protéine ZnT3, transporteur du métal dont on détaillera le rôle dans un chapitre suivant (Cf. II-3.2.1).

La relation étroite entre le système nerveux central et le zinc est mise en évidence par son implication dans des maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, par son rôle dans les troubles du comportement alimentaire comme l'anorexie mentale et dans des pathologies psychotiques comme la schizophrénie.

La maladie d'Alzheimer sera prise en exemple dans cet exposé pour illustrer l'influence du zinc sur le système nerveux central et en particulier pour mettre en évidence la neurotoxicité du métal lorsqu'il est présent à des concentrations élevées. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une démence résultante de l'installation progressive de deux types de lésions dans l'ensemble du cortex cérébral. Le premier type de lésion correspond à la formation de plaques amyloïdes (dépôts de polymères d'un fragment protéique nommé peptide « A β ») [28].

L'agrégation de protéines « tau » dans les neurones constitue le deuxième type de lésion. La conséquence de cette agrégation est une dégénérescence neurofibrillaire. Les conséquences cliniques de ces deux types de lésions apparaissent secondairement avec des troubles progressifs des fonctions intellectuelles évoluant vers les signes classiques d'une démence.

La protéine β -amyloïde que nous venons de citer se trouve dans tous les cerveaux sains sous forme soluble. L'agrégation du β -amyloïde soluble en plaques amyloïdes semble être à l'origine de la maladie. La précipitation et l'agrégation des protéines β -amyloïdes seraient la conséquence de plusieurs phénomènes comprenant entre autres une interaction anormale avec certains biométaux, dont le zinc [28, 29]. Il a été démontré que le zinc, le cuivre ou le fer sont présents au sein des plaques amyloïdes à des concentrations élevées et des études *in vitro* ont révélé que ces mêmes métaux favorisent l'agrégation du β -amyloïde. Cette hypothèse est renforcée par certains travaux qui évoquent l'amélioration du dépôt de plaques après chélation du métal dans des modèles animaux de maladie d'Alzheimer [30].

III-2.2.2. Zinc et système oculaire

Chez l'homme, le taux de zinc dans l'œil est particulièrement élevé par rapport aux autres tissus avec, par ordre décroissant de concentration la rétine et la choroïde puis les corps ciliaires, l'iris, le nerf optique, la sclère, la cornée et le cristallin [31]. Les taux peuvent varier fortement dans les différentes parties de l'œil en fonction de l'âge du patient. Cependant, les concentrations les plus fortes sont constamment retrouvées dans l'uvée et dans la rétine.

La teneur en zinc oculaire globalement élevée reflète le grand nombre d'enzymes à zinc présentes dans l'œil, dont certaines bien connues : la rétinol déshydrogénase, l'enzyme lysosomale alpha-mannosidase de l'épithélium pigmentaire rétinien, l'anhydrase carbonique des corps ciliaires, les collagénases cornéennes [14].

Le déficit en zinc, notamment dans l'acrodermatite entéropathique, s'accompagne de signes ophtalmologiques incluant blépharite, conjonctivite, opacités cornéennes et cataracte. De même, des études ont permis d'associer rétinite pigmentaire et ulcères de cornée récidivant avec une hypozincémie. Au total, bien que ces études tendent à prouver le rôle essentiel du zinc dans la fonction oculaire, elles restent parfois difficiles à interpréter par la co-existence de plusieurs déficits [31].

La supplémentation en zinc améliorerait la fonction visuelle de patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui est la première cause de cécité chez les sujets âgés. Dans cette maladie, l'épithélium pigmentaire rétinien, un tissu normalement très

riche en zinc, devient anormal, s'atrophie puis se détache et des néo-vascularisations choroïdiennes apparaissent souvent accompagnées d'exsudats voire d'hémorragies. On suppose que du zinc administré à ces patients pourrait atténuer ces lésions et améliorer en conséquence leur acuité visuelle.

III-2.2.3. Zinc et système reproducteur

Le sperme humain contient des concentrations élevées en zinc sous forme libre ou liée. Des taux anormaux d'oligo-éléments en particulier du zinc et du cuivre peuvent affecter la spermatogenèse, tant au niveau quantitatif que qualitatif, en agissant sur la production, la maturation, la motilité ou sur le pouvoir fécondant du gamète. La concentration totale en zinc dans le liquide séminal est extrêmement élevée (approximativement 2.0mM) et il est bien établi que c'est la prostate qui sécrète le métal aux concentrations les plus élevées.

Le zinc interagit à différents niveaux. Il influence la consommation d'oxygène locale du spermatozoïde, la décondensation chromatinienne et la réaction acrosomiale [32]. Par ailleurs, il présente des propriétés antimicrobiennes remarquables et est considéré comme le facteur prostatique antibactérien. Il pourrait interagir notamment avec des structures bactériennes comme les lipopolysaccharides (LPS) ou les superantigènes, probablement en altérant la structure de ces motifs. Son spectre antimicrobien est large comprenant des germes de la sphère génitale comme les *Trichomonas vaginalis*, les *Candida albicans*, et les *Chlamydiae trachomatis*. Il est cependant démontré que les conditions inflammatoires locales peuvent influencer considérablement la sécrétion de ces glandes.

Chez l'homme, les carences en zinc s'accompagnent d'un hypogonadisme caractérisé par une insuffisance du développement des caractères sexuels secondaires. En effet, la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig dépend de la concentration en zinc. Le métal est nécessaire à l'activité enzymatique de la 5- α -réductase qui permet la conversion de la testostérone en forme biologique active : la 5- α -dihydrotestostérone.

Bien qu'il soit établi qu'une baisse du zinc peut affecter la spermatogenèse aussi bien à un niveau quantitatif que qualitatif, la corrélation entre une concentration en zinc élevée dans le liquide séminal et la qualité du sperme est toujours controversée. Quelques études ont cependant montré un bénéfice en terme de numération, de motilité et de morphologie des spermatozoïdes chez des hommes présentant une oligoasthénozoospermie (OATS) idiopathique [33].

III-2.2.4. Zinc et système endocrine

Les troubles de croissance et les malformations congénitales qui peuvent résulter d'une carence en zinc mettent en avant le rôle régulateur de l'oligo-élément dans la division et la prolifération cellulaire. Sur le plan hormonal, le zinc apparaît essentiel à l'induction d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor I) et de l'hormone de croissance (GH), qui sont des promoteurs de la prolifération cellulaire [34]. L'hormone de croissance contient un site de liaison au zinc qui est structurellement et fonctionnellement important [35]. Les concentrations élevées de métal dans l'hypophyse antérieure permettent ainsi la formation de dimères de GH qui sont moins susceptibles de se dégrader. Ces dimères présentent une faible affinité pour les récepteurs à GH, ce qui permet d'éviter l'association de l'hormone avec un récepteur proche de l'hypophyse et qui permet de favoriser la liaison à des récepteurs situés en périphérie. La baisse de concentration de l'oligo-élément pourrait entraîner une dégradation accrue de l'hormone de croissance et influencer directement la synthèse des facteurs de croissance des cartilages par le foie. La présence de zinc multiplie également par 8000 la capacité de l'hormone de croissance à se lier au récepteur de la prolactine ; on peut d'ailleurs rappeler que le zinc potentialise l'effet de la prolactine [34].

Un autre rôle majeur du zinc dans la croissance et le développement de l'individu concerne son influence sur la physiologie osseuse. Les concentrations en zinc sont supérieures dans l'os par rapport aux autres tissus. Le métal est considéré comme un composant essentiel de la matrice calcifiée [36]. Intimement lié au métabolisme de l'os, le zinc régule positivement la croissance et le développement osseux en intervenant dans la synthèse des ADN et des ARN, qui accompagne la multiplication des chondrocytes, des ostéoblastes et des fibroblastes. Le zinc interagit avec de nombreuses hormones impliquées dans le métabolisme osseux comme la somatomédine C, l'ostéocalcine, et la phosphatase alcaline. Cette dernière, produite par les ostéoblastes, assure le dépôt de calcium dans les diaphyses [36]. De même, le zinc potentialise les effets de la vitamine D3 (qui intervient dans la fixation osseuse du calcium) en favorisant l'activité de l'hydroxylase rénale.

Une carence en zinc pourra perturber l'action d'hormones lipophiles stéroïdiennes et thyroïdiennes par la moindre fixation du métal sur leurs récepteurs hormonaux cytosoliques ou nucléaires. En effet, c'est par l'intermédiaire des motifs en doigts de zinc (Cf.II-2.1.2.2) que les récepteurs, une fois associés aux hormones, vont pouvoir se fixer à des éléments de réponse spécifiques de régions ADN promotrices et induire l'expression de gènes spécifiques

[37]. La déficience en zinc pourrait empêcher la fixation du complexe hormone-récepteur à l'ADN, ce qui rendrait vraisemblablement impossible l'activation des gènes régulés par les récepteurs et générerait les anomalies endocrines associées à la carence en zinc. Ainsi, le zinc influence de cette manière l'action d'hormones connues pour réguler la croissance osseuse, comme la testostérone, les hormones thyroïdiennes et l'insuline [38].

III-2.2.5. Zinc et système immunitaire

Bien que de nombreuses situations pathologiques (atteintes malignes, malnutrition, infections, inflammations chroniques) associent carence en zinc et immunodépression, c'est l'acrodermatite entéropathique qui semble être le meilleur modèle pour étudier l'influence du zinc sur l'altération du système immunitaire. Les patients porteurs de cette maladie génétique présentent sans supplémentation une atrophie thymique et une augmentation significative du nombre d'infections virales, bactériennes ou fongiques. En marge de cette affection très rare, certains groupes sont cependant plus exposés à ce risque comme les personnes âgées, les végétariens ou les insuffisants rénaux chroniques.

Les premières défenses de l'organisme non spécifiques sont altérées par un déficit en zinc. *In vitro*, le recrutement des polynucléaires neutrophiles et le chimiotactisme sont touchés. *In vivo*, la baisse de concentration en métal altère l'activité des cellules tueuses naturelles (NK) dédiées à la lutte primaire contre les infections et le développement de tumeurs. Au niveau cellulaire, le récepteur p58 (famille KIR) zinc dépendant, ne peut plus interagir avec le complexe majeur d'histo-compatibilité (CMH de classe I) [39]. De même, la phagocytose des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et la génération du stress oxydatif induite par des facteurs extra-granulocytaires de type particulaire ou moléculaire (bactéries, virus, agrégats moléculaires...) sont également influencés par une déplétion en zinc [40].

Outre l'immunité non spécifique, la déficience en zinc altère également les acteurs de l'immunité cellulaire. Ainsi, l'activité des cellules T cytotoxiques précurseurs CD8+, CD73+ décroît au cours d'un déficit en zinc. En effet, le métal est impliqué dans le développement des cellules T par son rôle de co-facteur de la thymuline. Cette hormone, produite par le thymus, est relarguée dans la circulation générale pour réguler non seulement la production des cellules T immatures mais également stimuler la division, la différenciation et la maturation des lymphocytes T cytotoxiques, « helpers » et suppresseurs. Elle module aussi la libération de différentes cytokines. Une hypozincémie provoquera une atrophie thymique et

une diminution de l'activité T cytotoxique liée à une diminution du taux de thymuline active. En outre, les cellules T « helper » CD4⁺ sont également sensibles à la concentration en zinc, avec pour conséquence une modification de la balance TH1/TH2. Les cytokines de type TH2 (IL-4, -6 et -10) ne sont pas modifiées par une hypozincémie contrairement aux cytokines TH1 (IFN γ et IL-2) dont la production est altérée. Ainsi, le zinc joue un rôle de modulateur essentiel du système immunitaire en agissant sur ce réseau complexe même s'il est incapable d'induire seul la production de cytokines.

Acteurs principaux de l'immunité humorale, les lymphocytes B sont moins soumis à la présence de zinc que les cellules T. En effet, seul le nombre des cellules pré-B, B immatures et, dans une moindre mesure des B mémoires est réduit au cours d'une hypozincémie, par induction de l'apoptose [41].

L'action immunitaire du zinc réside aussi dans ses liaisons avec une grande variété de molécules : protéines, neuropeptides, hormones, récepteurs hormonaux et facteurs de transcription [42].

Son rôle évident dans le système immunitaire permet d'envisager de nouvelles perspectives en thérapeutique. La supplémentation en zinc augmente le nombre de lymphocytes T CD4⁺, de NK, d'IL-2 et du récepteur soluble d'IL-2 (sIL-2R). Toutefois, le dosage optimal n'est pas totalement défini pour éviter l'effet inverse. Actuellement, on pense que la zincémie ne devrait pas dépasser 30 μ mol/L. A l'inverse, un effet immunosuppresseur pourrait être recherché pour des dosages plus élevés (100mg/jour) avec une inhibition de la fonction des lymphocytes T, une suppression de l'allo-réactivité et un blocage de la production d'IFN- α , ce qui pourrait être une alternative intéressante à la pharmacopée immunosuppressive «classique», car dénuée d'effets secondaires, notamment dans le cadre de la polyarthrite rhumatoïde ou dans la prévention du rejet de greffe [43].

Dans le cadre particulier du virus d'immunodéficience acquise (VIH), le zinc permet la multimérisation et l'activité enzymatique de l'intégrase virale par son motif en doigt de zinc [44]. Le zinc entre également dans la composition de la nucléocapside protéique de HIV-1. De plus, la protéine virale Tat (Transactivating protein) possède une région riche en cystéines qui permet la liaison au métal. Au total, l'utilisation du zinc pour l'expression génique, la multimérisation et l'intégration virale de HIV-1 en fait un virus zinc-dépendant. Cette propriété est à mettre en relation avec l'hypozincémie fréquente retrouvée chez les patients infectés par le HIV-1 [45]. Des concentrations basses de zinc plasmatique sont liées à la progression de la pathologie indépendamment de la numération des CD4, de la

concentration lymphocytaire, de l'âge et du régime alimentaire du patient. Enfin, le TNF (*Tumor Necrosis Factor*), qui est un marqueur d'évolutivité du VIH produit par les monocytes, est normalement inhibé par l'IL-4. Or, le déficit en zinc réduit la sécrétion d'IL-4 par les cellules T « helper » et donc favorise la progression de la maladie. En tous cas, il semble clair que le maintien d'un taux normal de zinc est nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire et que les individus atteints par le HIV-1 y sont particulièrement sensibles. En effet, bien qu'un déficit en métal soit associé à une baisse de la survie chez les patients HIV-1, l'excès de zinc stimule le développement du virus. Ainsi, en thérapeutique, il faudra considérer très prudemment une supplémentation en métal chez ces patients.

III-2.2.6. Zinc et appareil cutané

Le zinc, comme d'autres oligo-éléments, est essentiel au maintien de l'intégrité et de la qualité fonctionnelle du revêtement cutané. Il contribue, dans les fibroblastes, à la synthèse de protéines structurales assurant la cohésion tissulaire, comme l'élastine et le collagène (rôle dans le tonus du derme, de l'épiderme et dans la cicatrisation). Les carences en zinc et en cuivre provoquent une maturation insuffisante des fibroblastes et une diminution de volume des faisceaux de collagène.

Le zinc présente également des propriétés anti-oxydantes par son action au sein de la superoxyde dismutase (SOD) et par son action compétitrice vis-à-vis du fer dans la peroxydation lipidique. Il régule le chimiotactisme des polynucléaires et module la production des interleukines. Le métal, par l'intermédiaire de ces propriétés, permet la cicatrisation, la protection contre les radicaux libres, le vieillissement, les infections cutanées, l'eczéma, l'acné....[46]

Le zinc, qui intervient à tous les étages des synthèses et du catabolisme cellulaire peut également, en cas de carence, entraîner un défaut de maturation des kératinocytes. En cas de carence en zinc, les kératinocytes présentent une diminution de la synthèse de la kératine, protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui assure à la peau sa propriété d'imperméabilité. Dans cette situation, il y a persistance de noyaux cellulaires dans la couche cornée de l'épiderme (phénomène de parakératose) avec formation d'une peau sèche desquamante, ichtyosiforme (peau de serpent), de cheveux et d'ongles secs cassants et fragiles [14].

Le statut en zinc peut également perturber les propriétés qualitatives ou quantitatives du sébum. Le sébum, produit par les glandes sébacées, protège la peau contre la dessiccation en la graissant en surface, permet la lubrification des poils et exerce une action anti-

infectieuse. Il peut notamment y avoir une hypersécrétion de sébum sous l'influence d'androgènes. Chez l'homme, la testostérone est sécrétée par les cellules de Leydig et accessoirement par les glandes surrénales. Chez la femme, la présence de testostérone résulte de la transformation, au niveau de la peau, de précurseurs des androgènes (delta-4-androstènedione).

Dans l'acné, la sensibilité de la glande sébacée à l'action androgène est exacerbée. Cette sensibilité est liée à une hyperactivité de la 5 α -réductase, responsable de la transformation de la testostérone en sa forme active : la dihydrotestostérone. L'action du zinc dans l'acné s'effectue essentiellement à deux niveaux : inhibition de la 5 α -réductase et diminution du chimiotactisme des polynucléaires témoins de la réponse inflammatoire.

Le zinc, apporté sous forme de chélate d'acide aminé par voie cutanée locale et/ou orale permet d'obtenir un bénéfice net dans le traitement de l'acné inflammatoire.

II-3. Transport du zinc chez les mammifères

Le zinc, oligo-élément hydrophile présentant deux charges positives, ne peut pas traverser les membranes biologiques de manière passive. Il nécessite un transport spécifique. De nombreuses équipes ont étudié sur différents types cellulaires le transport du métal. Bien que ces systèmes divergent, les transporteurs de zinc présentent des caractéristiques physico-chimiques communes.

II-3.1. Gène / protéine *DCT1*

Le transporteur *DCT1*, aussi connu sous les noms de Nramp2 (natural resistance-associated macrophage protein-2) ou *DMT1* (divalent metal transporter 1), a été caractérisé pour la première fois chez les mammifères [47]. Il appartient à une grande famille de protéines, appelée CDF (Cation Diffusion Facilitator), dont les éléments sont tous intégralement membranaires et apparaissent hautement conservés au cours de l'évolution, depuis les bactéries jusqu'à l'homme [48]. L'analyse bio-informatique de sa séquence, a permis de prédire pour la protéine *DCT1* une organisation structurale en douze domaines transmembranaires, ainsi que des sites de glycosylations dans la quatrième boucle

extracellulaire [49]. La protéine *DCT1* est exprimée de façon ubiquitaire, et est présente plus particulièrement dans le duodénum proximal, sur la bordure en brosse des entérocytes [49].

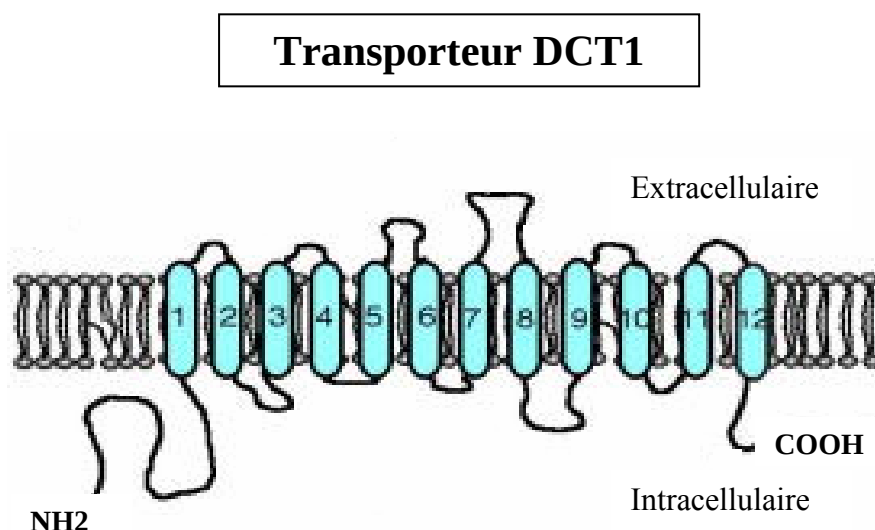


Schéma 3 : Topologie du transporteur membranaire *DCT1*

Sur le plan fonctionnel, ce transporteur membranaire est principalement responsable de l'absorption du fer alimentaire depuis la lumière duodénale vers le cytoplasme des cellules épithéliales. Il permet aussi l'acquisition du fer, à partir de la transferrine, dans les tissus périphériques [49]. Le mécanisme d'absorption propre à *DCT1* a pu être analysé dans l'oocyte de *Xenopus laevis* : dans ce modèle, il a été montré que le transport actif de l'ion métallique dépend du pH, du potentiel cytomembranaire, et est couplé au symport d'un proton. En outre, *DCT1* ne semble pas être spécifique du fer exclusivement. En dehors du fer, cette protéine membranaire possède également une affinité inhabituelle pour une large fourchette de cations divalents: Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Pb^{2+} . Bien que *DCT1* soit très différent des autres transporteurs de zinc connus, sa capacité à transporter ce métal est particulièrement efficace, puisque différentes études ont montré qu'une faible ingestion de fer augmente l'absorption intestinale de zinc. En somme, la spécificité tissulaire et l'activité de transporteur métallique de *DCT1* suggèrent un rôle possible joué par cette protéine dans le transport du

zinc. Etant donné que les affinités de *DCT1* pour les deux cations Fe^{2+} et Zn^{2+} sont semblables, le rétrocontrôle positif sur la synthèse de *DCT1*, observé en réponse à un faible statut en fer, pourrait engendrer en même temps une absorption accrue du zinc [49]. Toutefois, des publications plus récentes ont mis en doute l'activité de transport de zinc de *DCT1* dans certains systèmes [50].

II-3.2. Transporteurs de zinc de type SLC (Solute Carrier Family)

Outre *DCT1*, les transporteurs de zinc chez les mammifères sont regroupés au sein de deux grandes familles de gènes identifiés par des moyens variés comprenant le « screening » de bases de données EST, le clonage positionnel et la revue de banques cDNA. Ils codent pour des protéines des groupes ZnT (gènes *SLC30*) et ZiP (*Zrt* et *Irt-like protéins*: gènes *SLC39*) [51].

Les transporteurs ZnT et ZiP présentent des rôles opposés dans la régulation homéostatique du zinc cellulaire. Ainsi, les protéines ZnT réduisent le zinc intra-cytoplasmique en favorisant l'efflux hors des cellules ou vers des vésicules intracellulaires, tandis que les protéines ZiP augmentent le taux de zinc intra-cytoplasmique en favorisant le transport depuis l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et peut-être même depuis des compartiments intra-cellulaires vers le cytoplasme. L'implication de quelques protéines a été prouvée au cours d'études de sur-expression dans différents systèmes de levures, de cellules de mammifères et d'oocytes de *Xenopus*. Cependant, le fonctionnement précis de ces protéines n'est toujours pas complètement élucidé. Les séquences analysées suggèrent plutôt un transport non ATP dépendant mais utilisant soit un mécanisme de diffusion facilitée soit de symport [51].

II-3.2.1. Gènes *SLC30A*–Protéines ZnT

Précédemment nommée CDF pour *Cation Diffusion Facilitator*, la famille de gènes *SLC30* est décrite à l'heure actuelle avec plus de 100 membres à tous les niveaux phylogénétiques. Neuf membres sont individualisés chez les mammifères en 2005. Les protéines codées sont divisées en trois sous-groupes [52]. La sous-famille I se retrouvent essentiellement chez les procaryotes sauf pour ZnT9, tandis que les sous-familles II (ZnT1, 5, 6, 7 et 8) et III (ZnT2, 3 et 4) sont réparties à part égale entre les procaryotes et les eucaryotes.

La plupart de ces transporteurs possèdent six domaines trans-membranaires avec des extrémités N et C terminales intra cytoplasmiques, sauf pour la protéine ZnT5 qui présente entre six et neuf domaines trans-membranaires supplémentaires (en général 12) et qui possède une longue extrémité N-terminale. La plupart des protéines *SLC30A* se prolongent par une longue queue C-terminale. Les différents domaines sont en général séparés par de petites boucles, sauf pour la partie intra-cellulaire entre le IV et le V, longue boucle riche en résidus histidines (H) avec (HX)_n (3<n<6) qui pourrait être le site de liaison du métal [51].

Cette famille de protéines transporte donc le zinc depuis le cytoplasme soit à l'extérieur de la cellule, soit vers un compartiment intra-cellulaire. Mais à ce jour, nous avons peu de données ni sur le niveau énergétique utilisé par ces transporteurs, ni sur l'implication de cofacteurs pour le transport du zinc [30].

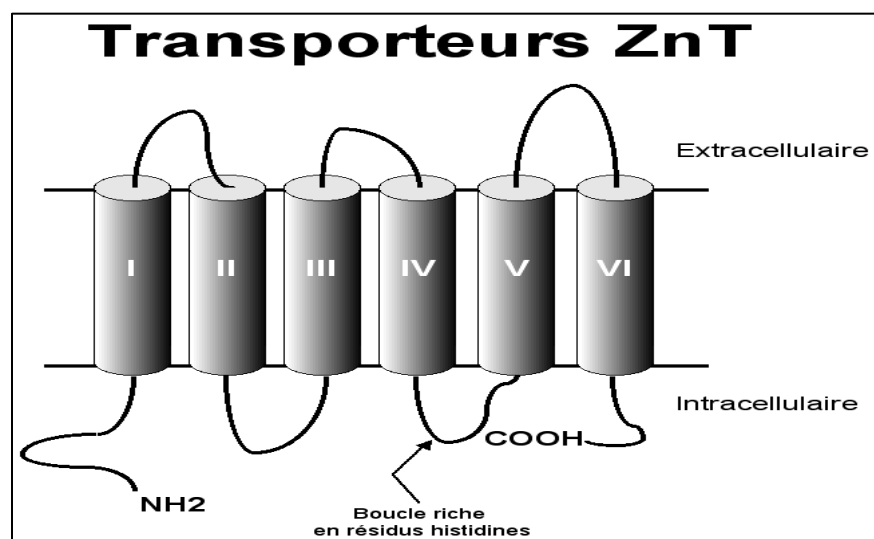


Schéma 4 : Topologie des transporteurs membranaires ZnT

Jusqu'en 2002, le gène *hSLC30A4* était considéré comme un candidat sérieux pour expliquer la physiopathologie de l'acrodermatite entéropathique humaine. En effet, chez la souris, on avait pu déterminer par cartographie chromosomique le lien entre une mutation ponctuelle au niveau du gène murin *SLC30A4* et une pathologie spécifique à cette espèce : le *lethal milk* (*lm*) [6]. Les mères de souriceaux (*lm*+) présentent un lait dépourvu en métal qui peut conduire au décès des nouveaux-nés par déficit en zinc.

Par analogie, il existe chez l'homme, une maladie génétique nommée «acrodermatite-like», résultant d'un déficit en zinc dans le lait maternel. Bien qu'elle semble être analogue au *lethal*

milk, cette pathologie humaine n'est pas liée à *hSLC30A4* [53]. En effet, l'étude mutationnelle de ce gène n'a pas mis en évidence d'anomalies moléculaires pouvant expliquer cette pathologie. De la même manière, ce gène candidat a été secondairement exclu pour l'acrodermatite entéropathique «classique» [7] après une étude similaire. La protéine codée par ce gène reste très abondante dans la glande mammaire, tout comme dans le cerveau, le rein, le foie, et avec un taux inférieur dans l'intestin grêle et le côlon [6].

De par leurs caractéristiques et leur localisation intestinale, d'autres membres de cette famille ont été étudiés comme candidats potentiellement à l'origine de l'AE. Ainsi, la protéine *hZnT1*, codée par le gène *hSLC30A1* est exprimée de manière ubiquiste notamment dans le rein et l'intestin grêle, c'est-à-dire dans des tissus dévolus à l'acquisition, au recyclage ou au transfert du métal [54]. Les *western-blot* effectués à partir de biopsies révèlent une présence plus importante de la protéine au niveau des villosités de l'intestin grêle proximal [49] et au niveau du pôle basolatéral des cellules du tube contourné ascendant, lui conférant ainsi un rôle majeur dans la réabsorption du métal. Les analyses mutationnelles effectuées par Küry et al., (données non publiées), sur des familles à AE n'avaient mis en relief aucune mutation ni polymorphisme, ce qui semblait indiquer un haut degré de conservation au cours de l'évolution, et par conséquent un rôle physiologique essentiel dans l'organisme, tout comme *hZnT4*.

Le gène *hSLC30A5* ne partage qu'une homologie très partielle avec les autres membres de cette famille, comme nous l'avons déjà vu plus haut. Cependant, la protéine *hZnT5* codée par ce gène est exprimée de manière ubiquiste dans les tissus humains testés, notamment dans le rein, le cerveau et l'intestin grêle [54]. Dans l'intestin, l'organe qui nous intéresse tout particulièrement dans l'AE, Cragg et al., [59] ont pu montrer une localisation préférentielle au niveau de la face apicale des entérocytes. D'autre part, l'expression hétérologue de *hZnT5* dans les oocytes de *Xenopus laevis* s'est avérée augmenter l'absorption du zinc au travers de la membrane plasmique. Cependant, l'analyse des séquences de ce gène candidat n'a révélé la présence d'aucune mutation susceptible d'être délétère. Depuis ces investigations, l'ARNm de *hSLC30A5* a été détecté par *northern-blot* plus particulièrement dans le pancréas endocrine, au niveau des îlots β de Langerhans. Par microscopie électronique, l'abondance de la protéine *hZnT5* dans les cellules des îlots β du pancréas humain et son association avec des granules contenant de l'insuline suggère son implication dans la séquestration du zinc par ces vésicules [54]. Enfin, des études de perte de fonction chez la souris K.O pour *mZnT5* révèlent un retard de croissance, une maigreur, une fatigue musculaire et une ostéopénie, par réduction de l'activité ostéoblastique. Cette faible adiposité des souris K.O pourrait être un effet

secondaire de la dysfonction des cellule β -pancréatiques. Ce génotype entraîne chez les mâles, des bradycardies sinusiennes et des arythmies fatales. Ces signes cliniques pourraient être dus à une régulation négative des gènes codant notamment pour les protéines « Heat shock protein » (HSP) [55]. Au total, les études expérimentales menées sur mZnT5 montrent une action de cette protéine dans la maturation ostéoblastique et dans la maintien d'une conduction cardiaque normale.

Enfin, deux gènes (*SLC30A6* et *SLC30A7*) décrits récemment semblent être très voisins, notamment par leur expression tissulaire sensiblement identique. L'étude de *SLC30A6* chez la souris a permis de détecter des transcrits par *northern*-blot principalement dans le foie, le rein, le cerveau et l'intestin grêle tandis que l'ARNm du gène murin *SLC30A7* a été détecté par la même technique principalement dans l'intestin grêle et le foie, suivis par ordre décroissant par la rate, le rein, et les poumons [56]. Cependant, il existe des divergences encore inexplicables entre les niveaux d'expression d'ARNm de *SLC30A6* et *SLC30A7* dans certains tissus et la présence des protéines codées par ces gènes dans ces même tissus [57],[56]. Comme aucunes publications n'attestent d'une étude d'expression chez l'homme, il nous a semblé nécessaire de la réaliser afin de confirmer ou d'infirmer les profils retrouvés chez la souris et d'évaluer l'importance de ces deux protéines dans l'absorption intestinale du métal chez l'homme.

La protéine hZnT3 codée par le gène h*SLC30A3* tient une place différente dans cette famille de par sa localisation préférentiellement cérébrale. Elle présente un intérêt mineur dans notre étude qui s'oriente vers des transporteurs à localisation intestinale préférentielle. Des études chez la souris ont permis de localiser cette protéine particulièrement dans l'hippocampe, au niveau des vésicules synaptiques de neurones glutaminergiques, dans le cortex cérébral et dans l'épendyme. Elle semble nécessiter la présence d'une protéine chaperonne AP-3 afin d'être incorporé à la membrane des vésicules synaptiques. Malgré les différents travaux menés sur le sujet, peu de choses est aujourd'hui connu au niveau du transport neuronal et de la transmission synaptique du zinc [58]. Ainsi, les équipes travaillant sur le métabolisme cérébral du métal s'intéressent à l'influence de la protéine ZnT3. Le zinc qui comme le glutamate, est séquestré puis relargué à partir de ces vésicules synaptiques pourrait présenter une fonction de neuro-modulateur. En outre, le zinc présent dans les synapses pourrait, en rapport avec sa localisation, contribuer au dépôt de plaques amyloïdes. Cette hypothèse est renforcée par certains travaux qui évoquent l'amélioration du dépôt de plaques après chélation du métal dans des modèles animaux de maladie d'Alzheimer [30]. Au

total, bien que cette protéine ne semble jouer aucun rôle dans l'absorption intestinale du zinc, elle joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cérébrale du zinc.

La protéine ZnT1, précédemment étudiée et présentant une distribution tissulaire large pourrait avoir une place centrale dans la physiologie cérébrale du zinc. En effet, des études menées chez la souris révèlent une expression cérébrale de ZnT1 particulièrement importante dans les zones de neurones riches en synapses à zinc, ce qui fait penser à un rôle protecteur du transporteur ZnT1 dans le système nerveux [59]. En effet, le contrôle de l'apoptose neuronal semble être influencé par la balance cellulaire en zinc, elle-même régulée par l'expression de ZnT1. D'après un modèle animal, il semble que l'augmentation de l'activité de ZnT1 protège contre les effets neurotoxiques du zinc [60] et qu'une souris K.O. pour ZnT1 n'est pas viable, prouvant que cette protéine joue également un rôle essentiel au cours du développement fœtal [51].

Enfin, *SLC30A9* dernier membre décrit à ce jour et répertorié dans la sous famille I n'a pas de rôle de transporteur de zinc encore établi avec certitude, et il n'y a pas de preuve que son expression soit régulée par le métal. Ce gène a été isolé à partir de cellules humaines MRC-5 [61] et code pour une protéine présentant une structure classique à six domaines trans-membranaires. La protéine ZnT9 migre depuis le cytoplasme vers le noyau pendant la phase S et interagit avec plusieurs protéines du cycle cellulaire [62]. Son expression tissulaire reste à déterminer pour connaître son intérêt dans le cadre de notre étude.

Gène	Locus	Taille de la protéine en aa	Expression tissulaire
<i>hSLC30A1</i>	Chromosome 1 1q32-q41	507 aa	ubiquitaire [63]
<i>hSLC30A2</i>	Chromosome 1 1p36.11	323 aa	ubiquitaire [64]
<i>hSLC30A3</i>	Chromosome 2 2p23.3	388 aa	cérébrale +++ [65]
<i>hSLC30A4</i>	Chromosome 15 15q21.1	429 aa	glande mammaire +++, prostate, cerveau [6]
<i>hSLC30A5</i>	Chromosome 5 5q13.1	765 aa	îlots β de Langerhans+++ [54, 66]
<i>hSLC30A6</i>	Chromosome 2 2p22.3	461 aa	foie, cerveau et poumons [57]
<i>hSLC30A7</i>	Chromosome 1 1p21.2	376 aa	intestin grêle, foie ++ chez la souris [56]
<i>hSLC30A8</i>	Chromosome 8 8q24.11	369 aa	pancréas, foie. [67]
<i>hSLC30A9</i>	Chromosome 4 4p13-p12	568 aa	pas de données bibliographiques

Tableau 2 : Gènes de la famille *hSLC30A*

II-3.2.2. Gènes SLC39A– Protéines ZiP

En marge de la famille de protéines ZnT participant à l'efflux du zinc, une deuxième famille de transporteurs d'ions métalliques, appelée ZiP (gènes *SLC39A*) est présente chez tous les eucaryotes. Chez la souris, 15 membres ont été identifiés. Par étude d'homologie de séquences, presque tous ces gènes sont conservés chez l'homme. Historiquement, les premiers membres identifiés, Zrt (*zinc-regulated transporter*) et Irt-like (*iron-regulated transporter*), ont donné leurs initiales à la famille ZiP. Zrt 1 et Zrt2 ont été isolés comme transporteurs respectivement de forte et de faible affinité pour le zinc chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et Irt1, d'abord comme le principal transporteur de fer dans les racines d'*Arabidopsis thaliana*, puis comme transporteur du Zn^{2+} , du Mn^{2+} et du Cd^{2+} .

Depuis les premières descriptions, la famille ZiP s'est agrandie à plus de 90 membres en 2004, incluant des protéines de bactéries, de nématodes, d'insectes et de mammifères. A titre d'exemple, ZupT est un transporteur de zinc chez *Escherichia coli*, tandis que d'autres ZiP sont impliquées, chez les plantes, dans le transport de zinc, de fer et/ou manganèse. Les résultats des études menées sur les transporteurs ZiP chez les champignons et les plantes suggèrent un rôle conservé de la famille ZiP dans le transport du zinc. Les bases de données bio-informatiques comptabilisent à ce jour 14 gènes hSLC39 codant pour autant de protéines ZiP chez l'homme.

La famille de protéines ZiP est divisée en quatre sous-familles basées sur les similarités aminoacides : I, II, gufA et LIV-1. Les trois membres de la sous famille II (ZiP1, 2 et 3), transporteurs exclusifs de zinc sont bien conservés chez les mammifères. Le premier membre de la famille LIV-1 (ZiP6), a été identifié comme protéine associée au cancer du sein dont l'expression est induite par les oestrogènes dans les cellules malignes. Chez la souris, neuf membres de ce sous-groupe sont identifiés dont trois (mZiP 4, 6 et 7) ont été caractérisés en détail, tout comme mZiP 5 très récemment [68].

Les membres de cette famille assurent le transport d'un ion métallique (essentiellement le zinc) à travers les différentes membranes cellulaires vers le cytoplasme. Bien que la plupart des transporteurs ZiP favorisent l'entrée du métal dans la cellule par la membrane cytoplasmique, certaines protéines sont responsables de l'efflux d'un substrat à partir de compartiments intra-cellulaires. Ainsi la protéine Zrt3, issue de levures, transporte le zinc en dehors de vésicules similaires aux lysosomes. L'ensemble des protéines de cette

famille présente de nombreuses similitudes structurales confirmées chez la levure, et pour quelques transporteurs, chez les mammifères.

Elles sont composées de huit domaines trans-membranaires présentant quelques caractéristiques communes.

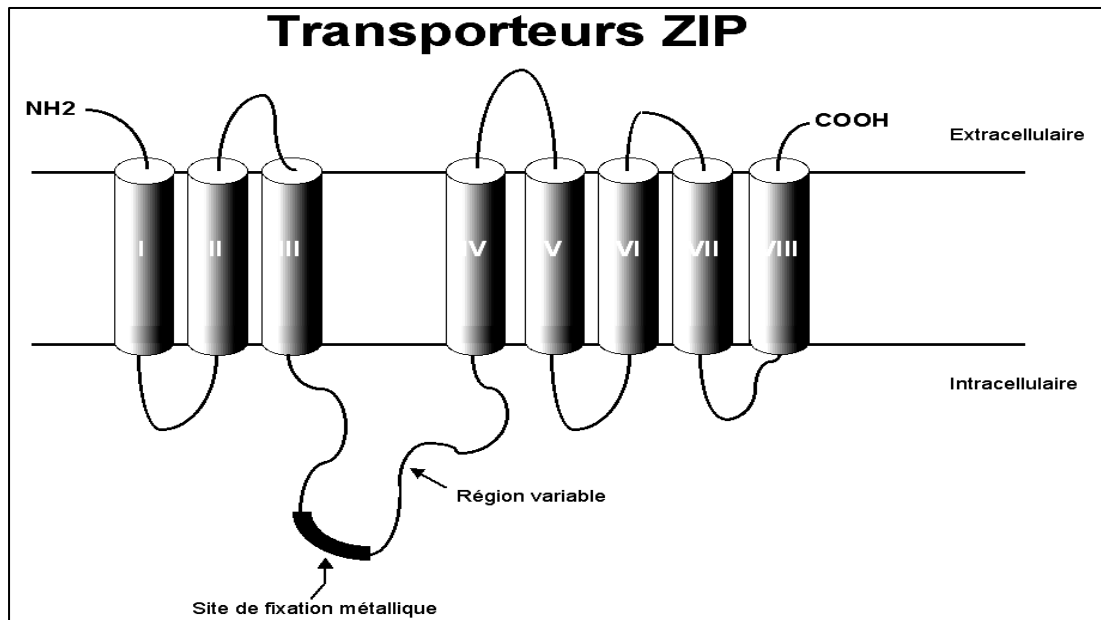


Schéma 5 : Topologie des transporteurs membranaires ZIP

Bien que les boucles entre les différents domaines trans-membranaires soient en général courtes, il existe une portion plus longue entre les domaines III et IV, riche en résidus histidines (H) avec une séquence répétée n fois $(HX)_n$, dont la fonction n'a pas été complètement élucidée à ce jour (n compris entre 3 et 5).

Le site de fixation du substrat a été localisé pour Irt1 sur la boucle extra-cellulaire entre les domaines trans-membranaires II et III. Pour certaines protéines, cette région serait également riche en histidines. La protéine hZip4, que nous décrirons plus en détail dans la suite de cet exposé, présente une particularité avec son long domaine N-terminal. De plus, les domaines trans-membranaires IV et V présentent des résidus histidines conservés, entourés d'acides aminés polaires ou chargés. Par leurs propriétés amphiphiles et leurs compositions en acides aminés conservés, ces domaines forment une cavité ou pore indispensable au passage du substrat [68].

Trois gènes de cette famille (hSLC39A1, hSLC39A4 et hSLC39A5) sont à rapprocher de par leur expression intestinale. Ainsi, ils pourraient jouer un rôle central dans le contrôle homéostatique du métal en régulant notamment l'absorption intestinale de l'oligo-élément.

Les études menées sur la protéine hZip1 codée par le gène *hSLC39A1*, ont permis de déterminer une expression ubiquitaire davantage marquée dans l'intestin grêle et le pancréas. Cette distribution large de hZip1 reflète son importance pour de nombreux types cellulaires [69]. L'expression de hZip1 semble être régulée par le statut en zinc et en hormones. En effet, d'après un modèle expérimental, l'expression de cette protéine est réprimée par une supplémentation en zinc, favorisée par une déplétion aiguë et induite par la prolactine.

Après des recherches infructueuses menées sur *hSL30A4* comme candidat pour l'AE, le gène *hSLC39A4* a été associé grâce à une approche par cartographie d'homozygotie, à cette pathologie humaine en 2002. L'expression ARN de *hSLC39A4* chez l'homme est importante dans l'intestin grêle, l'estomac, le côlon et le rein. Par étude immunohistochimique, la protéine hZip4 a été située sur la surface apicale de l'entérocyte. L'étude de la physiopathologie de l'AE, qui sera présentée dans le chapitre suivant, permettra de décrire en détail la structure, la fonction et la régulation de cette protéine de transport.

Le troisième gène : *hSLC39A5*, auparavant dénommé hORF1 et membre de la sous-famille LIV-1, présente également une expression intestinale majoritaire. Sa séquence est très proche de son homologue murin avec 84% d'identité et également des gènes *SLC39A4* d'origine humaine ou murine. Après analyse bio-informatique, les protéines hZip4 et hZip5 présentent une homologie d'environ 30%. L'expression de *hSLC39A5* déterminée par *northern-blot*, est plus importante dans l'intestin grêle, le côlon, le rein et le pancréas. Les deux protéines hZip4 et hZip5 sont donc des transporteurs voisins de par leurs structures et leurs profils d'expression tissulaire [70]. Wang K et collaborateurs [9] ont en déduit que la protéine hZip5 pouvait intervenir comme transporteur accessoire au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte. Au total, ce gène se révèle être l'un des meilleurs candidats pour être associé à *hSLC39A4* dans la pathogénie de l'AE. Il fera l'objet d'un travail plus approfondi dans la suite de cette étude.

En marge de ces trois gènes, d'autres membres de cette famille décrits plus récemment présentent des caractéristiques et des profils d'expression différents. Ainsi, l'expression du gène *hSLC39A6* semble être majoritaire dans la prostate, dans le placenta et dans les cellules mammaires. La protéine hZip6, induite par les oestrogènes serait impliquée dans le cancer du sein par son action de métalloprotéase qui permettrait le clivage de protéines de la membrane extra-cellulaire [71]. Elle favoriserait ainsi le développement tumoral et l'extension métastatique. Elle pourrait donc être utilisée comme marqueur biologique d'évolutivité dans ce type de cancer.

Les transcrits des gènes *hSLC39A7* et *hSLC39A14* présentent une distribution ubiquitaire avec cependant quelques particularités puisque la protéine codée par *hSLC39A7* est davantage retrouvée dans le placenta, les reins, la prostate et que la protéine *hZip14* est faiblement présente dans le tissu cérébral contrairement aux autres protéines de la famille LIV-1 [72]. En outre, la protéine *Zip7* pourrait intervenir également dans le transport intracellulaire du manganèse [73].

Enfin, parmi les autres gènes répertoriés dans les bases de données bio-informatiques, le gène *hSLC39A8* ou *BIGM103* semble être plus fortement exprimé dans le pancréas, les poumons, le foie et le thymus, ce qui l'éloigne naturellement d'un rôle de premier plan dans l'AE. Il en est de même avec le gène *hSLC39A2* qui serait majoritairement exprimé dans les cellules mononuclées sanguines [77]. Les autres gènes de cette famille (*SLC39A9* à *SLC39A13*) non décrits dans ce chapitre, n'ont fait l'objet d'aucune études approfondies et ont été nommés uniquement par prédiction bio-informatique en comparant leurs séquences nucléotidiques. Ils feront toutefois l'objet d'une étude d'expression afin de déterminer des candidats potentiels.

Gène	Locus	Taille de la protéine en aa	Expression tissulaire
<i>hSLC39A1</i>	Chromosome 1 1q21	324 aa	ubiquitaire intestin grêle +++ , pancréas [69, 74]
<i>hSLC39A2</i>	Chromosome 14 14q11.2	309 aa	cellules mononuclées sanguines [75]
<i>hSLC39A3</i>	Chromosome 19 19p13.3	314 aa	moelle osseuse, rate chez la souris [80]
<i>hSLC39A4</i>	Chromosome 8 8q24.3	626 aa	intestin grêle, estomac, côlon et rein [9], [8]
<i>hSLC39A5</i>	Chromosome 12 12q13.3	539 aa	foie, rein, pancréas, intestin grêle et côlon [70]
<i>hSLC39A6</i>	Chromosome 18 18q12.2	749 aa	prostate et placenta [76]
<i>hSLC39A7</i>	Chromosome 6 6p21.3	429 aa	ubiquitaire (placenta, foie, pancréas, reins et prostate ++) [73]
<i>hSLC39A8</i>	Chromosome 4 4q22-q24	460 aa	pancréas, poumons, foie et thymus [77]
<i>hSLC39A14</i>	Chromosome 8 8p21.3	492 aa	ubiquitaire[72]

Tableau 3 : Gènes de la famille *hSLC39A*

II-4. L'acrodermatite entéropathique

II-4.1. Introduction

L'acrodermatite entéropathique (AE) est un syndrome humain de déficience en zinc, dont l'origine est héréditaire ou acquise. La forme acquise qui ne concerne pas cet exposé peut être la conséquence d'une alimentation lactée pauvre en zinc chez le nourrisson, d'une nutrition parentérale prolongée ou d'un trouble métabolique (acidurie méthylmalonique, aminoacidopathies, acidémies organiques).

L'AE héréditaire est une pathologie rare de transmission autosomique récessive (AE ; OMIM 201100) rapportée pour la première fois par Brandt en 1936, chez des enfants présentant une dermatite et une malabsorption. Mais ce sont Danbolt et Closs [1] qui réalisèrent la première véritable description détaillée de l'affection, en 1942, et qui lui donnèrent son nom définitif.

II-4.2. Clinique

Apparaissant dès la naissance ou au moment du sevrage et sans aucune prédisposition sexuelle ou raciale apparente, l'AE se définit théoriquement par la présence de trois symptômes quasi-pathognomoniques : une dermatite acrale, faciale et péri-orificielle, une diarrhée et une alopecie généralisée qui touche l'ensemble du cuir chevelu, des sourcils et des cils [1]. Ces symptômes sont la conséquence d'une sévère déficience nutritionnelle en zinc, généralisée à tout l'organisme.

Les lésions dermatologiques sont symétriques, d'abord érythémato-squameuses, parfois papulaires avec des lésions en plaques convergentes qui prédominent essentiellement au niveau péri-orificiel (bouche, orbites, organes génitaux et anus) puis vésiculo-bulleuse. Les lésions cutanées sont volontiers érosives, pouvant s'accompagner d'un rash intense, et sont localisées principalement dans les régions autour des orifices naturels et aux extrémités des membres. Secondairement peuvent apparaître des bulles ou pustules témoins de surinfections, notamment par *Candida albicans* ou par certaines bactéries. Les lésions vieillissantes deviennent hyperkératosiques, notamment autour des ongles formant un périonyxis [1, 2].

Une diarrhée chronique avec des douleurs intermittentes, liée, le plus souvent, à une entéropathie exsudative, et, plus rarement, à un syndrome de malabsorption, peut être retrouvée, ce qui correspond à l'atteinte inflammatoire non spécifique de la muqueuse

digestive. Parfois, les lésions digestives touchent l'œsophage, provoquant une oesophagite [78].

Une alopecie diffuse, une décoloration des poils et des cheveux qui deviennent cassants et ternes ainsi qu'une atrophie unguéale peuvent être également observées.

En marge des signes cliniques majeurs de l'AE, le déficit en zinc peut entraîner des troubles ophtalmologiques comme une blépharite, une conjonctivite ou des opacités cornéennes. Des troubles de la fonction immunitaire, avec une augmentation de la susceptibilité aux infections et éventuellement un syndrome d'immuno-déficience généralisée pouvant être fatal, peuvent apparaître secondairement. Enfin, un retard de croissance, des troubles de l'humeur avec une irritabilité exacerbée, une anorexie ou une dépression mentale ont été également décrits [3]. Le nombre élevé de symptômes cliniques observés reflète le rôle clef du zinc dans de nombreuses voies métaboliques. En l'absence de traitement, l'affection évolue par poussées jusqu'à la mort de l'individu.

Au total, le diagnostic de l'AE se fait avant tout par la reconnaissance du tableau clinique très caractéristique d'une déficience généralisée en zinc. Il est basé principalement sur la présence simultanée d'une dermatose symétrique à la fois acrale et péri-orificielle, psoriasiforme, et/ou vésiculo-bulleuse, d'une alopecie, de diarrhées et de troubles de l'humeur [3].



Figure 1 : Lésions de la région péri-

Figure 2 : Plaques érythémateuses faciales

Images disponible sur le site Web :<http://www.emedicine.com/ped/topic3011.htm#section~pictures>

Les analyses de laboratoires peuvent compléter mais ne supplantent pas le diagnostic clinique. Le diagnostic repose sur la démonstration d'un taux plasmatique du zinc abaissé à 20 à 40% par rapport aux valeurs normales (le zinc sérique est plus élevé d'environ 15%). Les taux observés sont de 3 à 6 mmol/l alors que la normale est de 9 à 20mmol/. L'activité de la phosphatase alcaline plasmatique est abaissée parallèlement à l'hypozynguémie et se corrige avec elle sous traitement. L'interprétation de l'hypozynguémie est parfois délicate. Finalement, le meilleur test diagnostique est la correction spectaculaire des symptômes cliniques sous traitement par le gluconate de zinc.

II-4.3. Physiopathologie

Grâce à l'utilisation d'isotopes radioactifs du zinc, plusieurs équipes ont pu déterminer l'origine intestinale de l'AE. Il s'agit d'un défaut d'absorption jéjunale et duodénale qui réduit considérablement la quantité de zinc acheminée aux différents tissus de l'organisme [2, 4, 5]. Normalement, un individu adulte sain absorbe 60 à 70% de la dose standard de ⁶⁵Zn prise oralement et en élimine environ 0.7%. Par comparaison, les enfants souffrant de ce syndrome absorbent seulement 3% environ de la quantité ingérée et les adultes atteints en absorbent entre 15 et 40% [14]. *In vitro*, les biopsies muqueuses jéjunales de patients AE présentent le même effondrement d'absorption de ⁶⁵Zn quand elles sont comparées aux biopsies d'individus normaux. Ces données ont fait suggérer à certains auteurs l'hypothèse d'un défaut dans le ligand facilitateur du transport intestinal. Ces dernières années, la physiopathologie a pu être affinée au niveau moléculaire par le clonage et l'identification du gène causal *hSLC39A4*.

II-4.4. Caractéristiques du gène *hSLC39A4*

Le locus responsable de l'acrodermatite entéropathique a été localisé par cartographie d'homozygotie en 8q24.3[9]. Puis, deux équipes ont cloné dans cette région chromosomique le gène *hSLC39A4* responsable de la pathologie ([8, 9].

Le gène *hSLC39A4* est donc localisé sur le chromosome 8, en 8q24.3. Il s'étend sur 4475 paires des bases. Il existe deux transcrits alternatifs. Le premier (NM_017767), d'une longueur de 2317 paires de bases, comprend 11 exons et 10 introns. Le second (NM_130849), de 2192 paires de bases, compte 12 exons et 11 introns. La première forme code pour une protéine de 626 acides aminés. La seconde forme, qui code pour une protéine de 647 acides aminés correspond au recrutement des douze exons, sauf les 117 premières bases de l'exon 2,

éliminées lors de l'épissage en même temps que l'intron 1 ; le codon ATG de début de transcription se situe dans l'exon 1. Les travaux précédents menés sur ce gène ont permis de déduire que la forme majoritaire était celle comprenant les douze exons. C'est ce transcrit qui sera étudié par la suite.

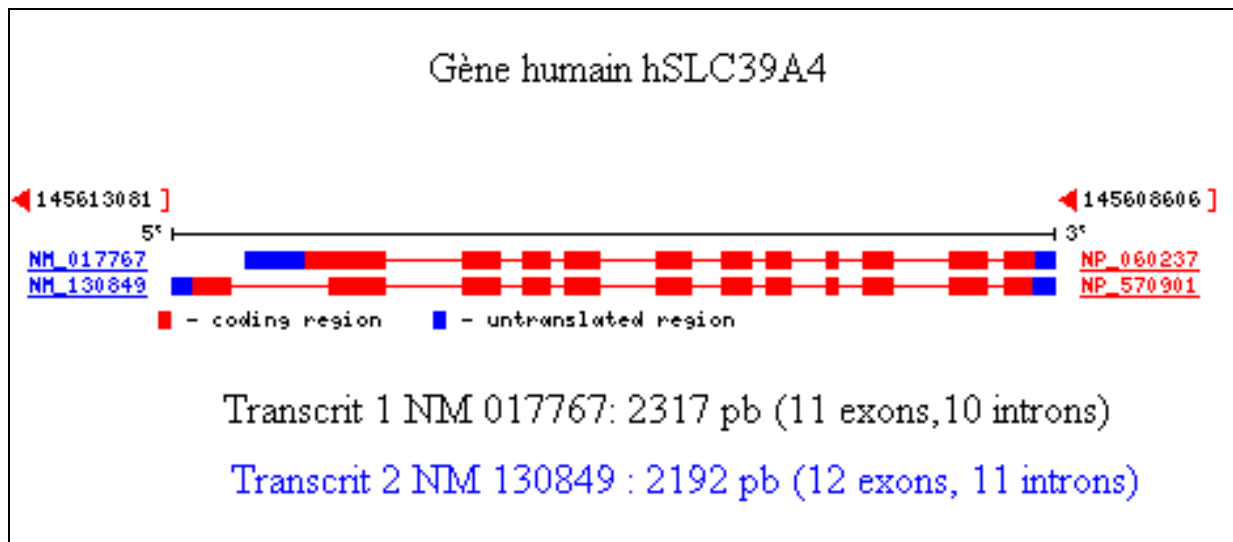


Schéma 6 : Représentation schématique du gène hSLC39A4

image disponible sur le site Web : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

La protéine majoritaire hZip4, de 647 acides aminés et d'un poids moléculaire de 68451 Daltons, appartient à la sous-famille LZT . Elle présente une structure typique de protéine de la famille Zip avec huit domaines transmembranaires répartis en deux blocs de trois et cinq unités et séparés par une boucle cytoplasmique, dite région variable, caractérisée par un motif riche en histidines. Très conservé au sein de cette famille, ce motif est décrit comme le site de fixation métallique des transporteurs.

L'expression de la protéine hZip4 chez l'homme est abondante dans l'intestin grêle, l'estomac, le côlon et le rein. Par étude immunohistochimique, hZip4 a été localisé sur la surface apicale de l'entérocyte. Les études de transfection du gène homologue murin mZip4 dans une cellule HEK293 ont permis de montrer que l'entrée de ^{65}Zn était régie par un mécanisme à cinétique saturable et hautement spécifique. De plus, il est maintenant admis que l'expression de ce transporteur est augmentée dans l'intestin grêle pour un régime déplété en zinc, et diminuée après supplémentation en métal. Ainsi, ce transporteur joue un rôle essentiel dans la régulation homéostatique du zinc.

A ce jour, plusieurs mutations, incluant des mutations faux-sens et non-sens (codons stop prématurés) ont été trouvées dans la séquence du gène de patients atteints d'AE. Ces données ont permis de fournir une relation certaine entre un défaut de transport intestinal en zinc et cette pathologie. Cependant, depuis de nombreuses années, il a été constaté que l'administration orale de zinc compense ce déficit chez les patients AE. Il est donc possible que, dans cette situation, le zinc soit absorbé par des transporteurs de zinc de faible affinité ou par une voie inter-cellulaire. Cette seconde hypothèse physiopathologique correspondra à une partie de notre étude.

II-4.5. Spectre des mutations de *hSLC39A4*

L'analyse mutationnelle menée sur le gène *hSLC39A4* a permis d'individualiser plusieurs types d'anomalies [79]. A ce jour, deux mutations non sens ont été décrites. La mutation p.Leu48X (c.143T>G) située dans l'exon 1 et la mutation p.Trp401X (c.1203G>A) dans l'exon 7 provoquent la perte de plusieurs domaines transmembranaires et du site de fixation du zinc, altérant gravement la fonction protéique [79].

Les mutations faux-sens peuvent modifier la conformation protéique et inhiber la fonction de transporteur du zinc. Nous l'avons observé avec la mutation p.Cys62Arg qui induit le remplacement d'une cystéine par une arginine (c.184T>C). Elle entraîne ainsi la perte d'un pont disulfure qui intervient dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Il en est de même avec la substitution c.599C>T (p.Pro200Leu) qui, de par sa proximité avec le deuxième domaine trans-membranaire influe sur le fonctionnement protéique. En 2002, Wang et collaborateurs [9] ont publié trois autres mutations (p.Gly330Asp, p.Leu372Pro, et la p.Gly630Arg) ségrégeant dans des familles consanguines égyptiennes et jordaniennes. Elles entraînent des substitutions d'acides aminés très conservés dans les domaines transmembranaires, ayant des conséquences sur la glycosylation et donc sur l'adressage membranaire de la protéine.

Des mutations introniques ont également été décrites. Elles peuvent affecter l'épissage ; comme la mutation c.475-2A>G qui empêche le recrutement de l'exon 2 ou bien la mutation c.1150-2A>G au niveau de l'intron 6 [79].

Les mutations c.193-113T>C, c.850G>A (p.Glu284Lys) et c.1576G>A (p.Gly526Arg)) nécessitent des études complémentaires, car leurs implications dans la physiopathologie de l'AE n'a pas pu être élucidé à ce jour [79].

En marge, la modification c.751C>T (p.Arg251Trp), décrite dans l'exon 4 par deux équipes [9, 79], pourrait être en réalité un polymorphisme, du fait de sa fréquence dans la population générale.

Récemment, une équipe japonaise [80] a étoffé le spectre des mutations du gène *hSLC39A4* en individualisant une insertion (c.1017ins53) qui aboutit à un codon stop prématuré juste après le site d'insertion dans l'exon 6. La protéine résultante est alors amputée de sept domaines trans-membranaires et du site de fixation du zinc. La substitution (c.283C>T) retrouvée dans l'exon 2 change une arginine en cystéine (p.Arg95Cys). Mais, l'implication de cette substitution est par contre plus difficile à estimer, car les données fonctionnelles manquent pour cette région. On retrouve pour une deuxième famille nippone la substitution c.909G>C dans l'exon 5, qui modifie une glutamine en histidine en position 303 de la protéine (p.Glu303His). Il s'agit dans ce cas d'une substitution d'un acide aminé hautement conservé dans la famille de protéines ZiP à l'origine d'une altération fonctionnelle importante [80].

Après cette étude mutationnelle et en regroupant les données des trois équipes travaillant sur ce gène [9, 79, 80], on ne retrouve pas de «points chauds» de mutations sur le gène *hSLC39A4*. En effet, les modifications nucléotidiques se répartissent sur l'ensemble de la séquence codante mais aussi dans des régions introniques variables. Le spectre des mutations est très étendu, puisqu'on retrouve autant de mutations non-sens, faux-sens que de petites délétions. Au total, il y a presque autant de nouveaux cas d'acrodermatite entéropathique que de mutations décrites. D'autre part, il n'a pas été établi à ce jour de relation phénotype-génotype, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'association entre une forme clinique et une mutation donnée.

Par ailleurs, les résultats des analyses mutationnelles rapportées suggèrent une plus ou moins grande spécificité des mutations par rapport à la région de provenance des individus à AE ; ainsi la délétion de cinq paires de bases de l'exon 7 (1223-1227delCCGGG) apparaît spécifique de la Tunisie, alors que la délétion de l'exon 5 (968-971delAGCT) semble spécifique de l'ouest de la France, tout comme la mutation de l'intron 1 (192+19G>A).

Origine géographique	Mutation nucléotidique	Mutation protéique	Localisation	Fréquence
Tunisie	c.143T>G	p.Leu48X	exon 1	0/200
France	c.184T>C	p.Cys62Arg	exon 1	0/20
France	c.192+19G>A		intron 1	0/200
France	c.193-113T>C		exon 2	0/200
Japon	c.283C>T	p.Arg95Cys	exon 2	0/100
Egypte	c.351C>T	p.Pro84Leu	exon 2	3/120
France	c.418C>A	p.Asn106Lys	exon2	0/120
France	c.475-2A>G		intron 2	0/200
France Autriche	c.599C>T	p.Pro200Leu	exon 3	0/200
France-Pays-bas	c.751C>T= SNP	p.Arg251Trp	exon 4	7/200
France	c.850G>A	p.Glu284Lys	exon 5	0/200
Japon	c.909G>C	p.Gln303His	exon 5	0/100
USA (hispanique)	c.926G>A	p.Cys309Tyr	exon5	pas de données
France	c.968_971delAGCT		exon 5	0/200
Japon	c.1017ins53		exon 6	pas de données
Egypte	c.1089G>A	p.Glu330Asp	exon6	0/80
France	c.1120G>A	p.Gly374Arg	exon 6	0/200
France Egypte	c.1150-2A>G		intron 6	0/200
Egypte	c.1215T>C	p.Leu372Pro	exon6	0/80
Autriche	c.1203G>A	p.Trp401X	exon 7	0/200
Egypte	c.1229T>C	p.Leu410Pro	exon 7	pas de données
Tunisie	c.1223_1227delCCGGG		exon 7	pas de données
France	c.1576G>A	p.Gly526Arg	exon 10	0/200
Jordanie	c.1988G>C	p.Gly630Arg	exon 12	0/100

Tableau 4 : Base de données des mutations de *hSLC39A4*

OBJECTIF DE L'ETUDE

Nous sommes partis du constat que pour un certain nombre de patients étudiés avec un syndrome clinique d'AE, nous ne retrouvions pas de mutations homozygotes ou hétérozygotes composites après séquençage du gène *hSLC39A4*. Cette situation avait déjà été établie en parallèle par une deuxième équipe [9] travaillant sur ce sujet. Nous nous sommes donc fixé comme objectif de mettre en évidence un autre mécanisme moléculaire pouvant expliquer leurs pathologies. Nous avons mis au point une technique de PCR semi-quantitative (QMPSF) permettant la mise en évidence d'éventuels grands réarrangements du gène *hSLC39A4* [10]. En parallèle, à partir des données bio-informatiques, des clonages *in silico* de l'ensemble des gènes transporteurs de zinc et des données de la littérature, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'expression des gènes de ces familles partiellement ou non étudiés à ce jour. Nous avons retenu pour notre étude uniquement les gènes ayant une expression intestinale importante pouvant jouer un rôle dans l'absorption du métal à côté de la protéine hZip4 codée par le gène *hSLC39A4*. Au total, nous avons analysé les différents résultats obtenus après mise au point de la QMPSF et du séquençage des gènes candidats.

III. MATERIEL ET METHODES

III-1. Recueil des patients

14 patients ont été sélectionnés parmi différentes familles déjà étudiées au laboratoire (Tableau 5). Leurs origines géographiques sont très variables puisque cette étude a bénéficié d'un recrutement mondial (France, Allemagne, Espagne, Tunisie, Lituanie, Etats-Unis). Ils répondent tous à des critères cliniques d'acrodermatite entéropathique (AE) définis par leurs médecins, avec une rémission complète des symptômes sous traitement oral par sels de zinc.

Au niveau moléculaire, les 14 patients inclus dans cette étude ont précédemment été analysés au laboratoire du CHU de Nantes. Ils présentaient soit une mutation à l'état hétérozygote, soit aucune mutation détectable après séquençage complet du gène *hSLC39A4*. Un consentement libre et éclairé permettant la recherche d'une mutation sur l'ADN génomique a été obtenu pour chaque personne prélevée.

III-2. Extraction et dosage de l'ADN

L'ADN des différents patients a été extrait à partir d'un prélèvement de sang veineux périphérique recueilli sur tube EDTA grâce au kit d'extraction Nucleon BACC2 (Amersham™ Pharmacia Biotech Pty. Ltd., Sydney, Australia) en suivant le protocole écrit par le fabricant.

Les extraits d'ADN ont été ensuite dosés sur un spectrophotomètre UV/Visible NanoDrop de Nyxor Biotech™, permettant la mesure, sur 1 µl d'échantillon, de la concentration en acides nucléiques de l'échantillon. Les différents extraits ont été dilués dans un tampon TE 20 : 1 de manière à obtenir des concentrations identiques à 20 ng/µL.

Patient	Origine	Mutation nucléotidique	Localisation	Statut génétique	Statut clinique
1	France	c.1150-2A>G	intron 6	hétérozygote	malade
2	Allemagne	c.251C>T	exon 2	hétérozygote	malade
3	USA	c.751C>T	exon 4	hétérozygote	malade
4	Allemagne	c.599C>T	exon 3	hétérozygote	malade
5	Tunisie	aucune	-	normal/normal	malade
6	Tunisie	aucune	-	normal/normal	malade
7	Tunisie	c.1223-1227delCCGGG	exon 7	hétérozygote	malade
8	Lituanie	aucune	-	normal/normal	malade
9	Allemagne	aucune	-	normal/normal	malade
10	France	aucune	-	normal/normal	malade
11	Espagne	c.763delC	exon 4	hétérozygote	malade
12	France	aucune	-	normal/normal	malade
13	Espagne	aucune	-	normal/normal	malade
14	France	aucune	-	normal/normal	malade

Tableau 5 : Patients atteints d’AE et inclus dans cette étude

III-3. Technique QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) appliquée au gène *hSLC39A4*

La détection de réarrangements génomiques possible uniquement par *Southern*-blot jusqu’à récemment est difficile. Pour faciliter la détection de ces grands réarrangements, une équipe française a développé une technique semi-quantitative basée sur l’amplification multiple par PCR de courts fragments fluorescents [10].

La QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) permet ainsi la mise en évidence de délétions mais également de duplications génomiques. Cette technique présente plusieurs particularités. Elle est d’abord basée sur la co-amplification de plusieurs fragments du gène à analyser avec un fragment d’un gène non impliqué dans la pathologie servant de témoin interne. D’autre part, les fragments sélectionnés pour cette technique sont courts et de taille proche afin d’éviter l’amplification préférentielle des petits fragments. Enfin, le nombre de cycles programmé au cours de la PCR est limité pour rester dans la phase exponentielle de la réaction. Les amorces nucléotidiques sont chimériques : leur

partie 3' est complémentaire et spécifique de la séquence cible, tandis que les 10 à 11 premières bases en 5' correspondent à une séquence particulière, ne s'hybridant pas à la séquence cible et dont la fonction est d'uniformiser les rendements des différentes PCR qui constituent la QM-PSF. Les amorces sont également marquées à une extrémité par un fluorochrome. L'analyse des résultats s'effectue après migration des différents produits d'amplification sur un séquenceur automatique grâce à un logiciel spécifique. L'analyse des résultats est basée sur la hauteur des pics obtenue. Un pic exonique qui, chez un patient, présente une intensité de fluorescence deux fois inférieure à celle d'un témoin sain est la conséquence d'une délétion de ce même exon. A l'opposé, un pic une fois et demi-supérieur au témoin correspondra à une duplication du même exon. L'interprétation peut être parfois plus délicate nécessitant le calcul de l'aire sous la courbe et non plus la simple estimation de la hauteur du pic.

Nous avons étudié par cette technique l'ensemble des 14 patients inclus dans ce projet, qui, bien qu'atteints cliniquement d'acrodermatite entéropathique, ne présentaient qu'une mutation sur un allèle ou bien aucune mutation après séquençage complet du gène *hSLC39A4*. A partir de l'ADN génomique issu de ces patients, de courts fragments exoniques correspondant aux 12 exons du gène *SLC39A4* ont été co-amplifiés avec un fragment de l'exon 14 du gène *MLH1* considéré comme le témoin interne de la réaction. Secondairement, la partie promotrice du gène *hSLC39A4* s'étendant sur 5 kilobases a été divisée arbitrairement en cinq fragments de 1 kilobase et étudiée de la même manière.

Les amorces nucléotidiques ont été désignées grâce à l'aide du logiciel d'analyse Primer3™ développé par le Howard Hughes Medical Institute (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Ce logiciel nous a permis de vérifier l'absence de formations de structures secondaires et de connaître la température d'hybridation des amorces choisies. La taille des amplicons pour l'étude du gène *hSLC39A4* s'étend entre 118 et 313 paires de bases. Les séquences des amorces sélectionnées sont répertoriées en annexe (tableau 23). L'utilisation de courts amplicons (taille optimale comprise entre 150 et 350 paires de bases) permet une amplification plus courte, une séparation électrophorétique plus rapide et des pics fluorescents ayant un rendement supérieur. Comme nous venons de le voir, toutes ces amorces sont chimériques, c'est à dire qu'elles portent une extension spécifique cgtagatag en 5' pour l'amorce sens et gatagggttag pour l'amorce anti-sens. L'amorce sens de chaque paire est marquée en 5' par le fluorochrome 6-FAM.

La QM-PSF se décompose en plusieurs temps : la première étape consiste en une amplification PCR, suivie d'une migration électrophorétique sur séquenceur automatique avec

génération des pics par l'ordinateur. Enfin, la dernière étape consiste en l'analyse des génotypes par un logiciel dédié.

Le choix des PCR composant chaque PCR « multiplexe » a nécessité une mise au point pour savoir quels produits pouvaient être coamplifiés. En effet, l'association de plusieurs PCR dans la même réaction est soumise à différentes contraintes. Nous ne pouvons associer que des produits de tailles sensiblement différentes (différence minimale de 3 paires de bases). De même, il est préférable de ne pas choisir des produits d'exons successifs dans la séquence du gène pour faciliter l'interprétation des résultats. Il existe d'autres restrictions comme la nécessité pour les différents produits d'amplification de présenter des températures d'hybridation proches pour assurer une coamplification correcte. L'ensemble de ces contraintes nous a conduit à procéder par étape pour la mise au point. Chaque réaction de PCR a d'abord été réalisée en « simplexe » en réalisant un gradient de température. On a pu ainsi séparer trois groupes d'exons par rapport à leur température d'hybridation optimale (60°C, 63°C et 65°C). Nous avons ensuite associé deux, puis trois produits et ainsi de suite avec le témoin interne MLH-1 en s'assurant de respecter les conditions décrites ci-dessus.

Une fois la mise au point réalisée, les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume de 25 µL comprenant 2mM de chaque dNTP, 5 mM de MgCl₂, 1 Unité de Taq DNA polymérase Platinum (Invitrogen™), 7.5% de diméthyl sulfoxyde (DMSO) et de 100 ng d'ADN. Les amorces ont d'abord été testées de manière équimolaire, puis leurs concentrations ont été adaptées afin d'obtenir des pics fluorescents d'un même ordre de grandeur pour chacun des produits PCR constituant les PCR multiplexes. C'est pour cette raison que l'on retrouve des concentrations d'amorces variables comprises entre 0.075µM et 1 µM. Pour les réactions de PCR multiplexe 1 et multiplexe 4, 22 cycles d'amplification sont recommandés pour bénéficier d'une analyse optimale. Les réactions des PCR multiplexes 2 et 3 nécessitent respectivement 21 et 23 cycles. L'ensemble de ces PCR fonctionne avec une étape initiale de dénaturation à 95°C, suivie de 21 à 23 cycles comprenant trois étapes : une dénaturation de 30 secondes à 95°C, une hybridation spécifique (63°C pour la multiplexe 1 et 4, 60°C pour la multiplexe 2, 65°C pour la troisième multiplexe) et une extension à 72°C pendant une minute. Enfin, une extension terminale à 72°C pendant 5 minutes conclut le programme (tableaux 6, 7, 8 et 9). L'ensemble de ces étapes est réalisée sur des thermocycleurs Gene Amp 9700 de la société Applied Biosystems™.

L'amplification de la partie promotrice nécessite, selon les régions, de 21 à 23 cycles avec une température d'hybridation comprise entre 63°C et 66°C selon les fragments ; le reste de la programmation PCR restant identique (tableaux 10 à 13).

Afin d'analyser ces produits PCR sur le séquenceur automatique (Applied Biosystems 3100™), on utilise des plaques sécables contenant 96 puits. Dans chaque puits, on ajoute à 18µL de formamide, 1µL de standard de taille (Rox500, Applied Biosystems™) et 2µL de produit PCR. La plaque sécable contenant ces produits est ensuite centrifugée puis dénaturée pendant 3 minutes à 95°C. Les fragments d'ADN sont ensuite séparés sur le séquenceur ABI Prism 3100™. Les données sont analysées avec le logiciel GeneScan 3.1™ qui permet de normaliser les intensités de fluorescence en faisant varier l'échelle verticale de l'électrophorégramme et en ajustant au même niveau le pic de l'exon 14 du gène MLH-1 (témoin interne) du témoin sain avec celui du patient testé. C'est après cet ajustement que l'on pourra évaluer pour l'ensemble des échantillons la présence ou l'absence de délétions ou de duplications d'un ou plusieurs exons. La diminution d'un facteur 2 d'un amplicon révélera une délétion tandis que l'augmentation par un facteur 1.5 mettra en évidence une duplication.

PRODUIT : Multiplexe 1		Concentration finale	PROGRAMME PCR/ M1	
Tampon 10X Invitrogen™		1 X	95°C---9 minutes	
MgCl ₂ Invitrogen™		5 mM		
dNTP		0,2 mM		
DMSO		7.5 %		
PRIMERS			22 X { 95°C---30 Sec 63°C---40 sec 72°C---1 min 72°C---5 min	
MLH1	181 pb	0.625 µM		
Exon 3	118 pb	0.625 µM		
Exon 7	131 pb	0.625 µM		
Exon 10	157 pb	1 µM		
Exon 2	205 pb	0.625 µM		
H ₂ O	qsp 25 µL			

Tableau 6 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 3, 7, 10 et 2 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT :Multiplexe 2		Concentration finale	PROGRAMME PCR/ M2	
Tampon 10X Invitrogen™		1 X	21 X { 95°C---9 minutes { 95°C---30 Sec 60°C---40 sec 72°C---1 min 72°C---5 min	
MgCl ₂ Invitogen™		5 mM		
dNTP		0,2 mM		
DMSO		7.5 %		
PRIMERS				
MLH-1	181 pb	0.625 μM		
Exon 8	118 pb	0.625 μM		
Exon 5	133 pb	0.625 μM		
Exon 11	293 pb	1 μM		
H2O	qsp 25 μL			

Tableau 7 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 8, 5 et 11 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Multiplexe 3		Concentration finale	PROGRAMME PCR/ M3	
Tampon 10X Invitrogen™		1 X	23 X { { {	95°C---9 minutes 95°C---30 Sec 65°C---40 sec 72°C---1 min 72°C---5 min
MgCl ₂ Invitogen™		5 mM		
dNTP		0,2 mM		
DMSO		7.5 %		
PRIMERS				
MLH-1	181 pb	1 µM		
Exon 6	121 pb	0.075 µM		
Exon 12	127 pb	0.625 µM		
Exon 9	150 pb	1 µM		
Exon 1	168 pb	0.075 µM		
H2O		qsp 25 µL		

Tableau 8 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons 6, 12, 9 et 1 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Multiplexe 4		Concentration finale	PROGRAMME PCR/ M4	
Tampon 10X Invitrogen™		1 X	{ 22 X { { {	95°C---9 minutes
MgCl ₂ Invitrogen™		5 mM		
dNTP		2 mM		
DMSO		7.5 %		95°C---30 Sec
PRIMERS				63°C---40 sec
MLH-1	181 pb	0.625 µM		72°C---1 min
Exon 4	169 pb	0.625 µM		72°C---5 min
H2O	qsp 25 µL			

Tableau 9 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de l'exon 4 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Promoteur Multiplexe 1		Concentration finale	PROGRAMME PCR/ Promoteur M1	
Tampon 10X Invitrogen™		1 X	{ 21 X { { {	95°C---9 minutes
MgCl ₂ Invitrogen™		5 mM		
dNTP		0,2 mM		
DMSO		7.5 %		95°C---30 Sec
PRIMERS				63°C---40 sec
MLH-1	181 pb	0.5 µM		72°C---1 min
5UTR-4	132 pb	0,5 µM		72°C---5 min
5UTR-3	152 pb	0.5 µM		
H2O	qsp 25 µL			

Tableau 10 : Caractéristiques et conditions d'amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-4 et 5UTR-3 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Promoteur Multiplexe 2	Concentration finale	PROGRAMME PCR/ Promoteur M2
Tampon 10X Invitrogen™	1 X	95°C---9 minutes 21X { 95°C---30 Sec { 63°C---40 sec { 72°C---1 min 72°C---5 min
MgCl ₂ Invitrogen™	5 mM	
dNTP	0,2 mM	
DMSO	7.5 %	
PRIMERS		
MLH-1 181 pb	0.5 µM	
5UTR-5 148 pb	0.5 µM	
H2O qsp 25 µL		

Tableau 11 : Caractéristiques et conditions d’amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-5 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Promoteur Multiplexe 3	Concentration finale	PROGRAMME PCR/ Promoteur M3
Tampon 10X Invitrogen™	1 X	95°C---9 minutes 22 X { 95°C---30 Sec { 65°C---40 sec { 72°C---1 min 72°C---5 min
MgCl ₂ Invitrogen™	5 mM	
dNTP	0,2 mM	
DMSO	7.5 %	
PRIMERS		
MLH-1 181 pb	0.5 µM	
5UTR-2 148 pb	0.5 µM	
H2O qsp 25 µL		

Tableau 12 : Caractéristiques et conditions d’amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-2 de hSLC39A4 par QM-PSF

PRODUIT : Promoteur Multiplexe 4	Concentration finale	PROGRAMME PCR/ Promoteur M4
Tampon 10X Invitrogen™	1 X	95°C---9 minutes { 23X { { 95°C---30 Sec 66°C---40 sec 72°C---1 min 72°C---5 min
MgCl ₂ Invitrogen™	5 mM	
dNTP	0.2 mM	
DMSO	7.5 %	
PRIMERS		
MLH-1 181 pb	0.5 µM	
5UTR-1 313 pb	0.5 µM	
H2O qsp 25 µL		

Tableau 13 : Caractéristiques et conditions d’amplification PCR de la partie promotrice 5UTR-1 de hSLC39A4 par QM-PSF

III-4. Etude d’expression des différents gènes du transport de zinc

Dans un premier temps, des amorces spécifiques des parties codantes de chacun des gènes candidats ont été désignées grâce au logiciel Oligo 4™ (Cf. annexes : tableau 25). La mise au point des conditions optimales d’amplification PCR a été réalisée à partir d’ADN d’un individu ne présentant pas la pathologie étudiée et n’ayant aucun lien avec les individus d’AE. Le mélange réactionnel de PCR ainsi déterminé comprend (volume final de 50µL) :

Mélange réactionnel	Volume en µL
dNTP 2.5 mM chaque	4 µL
Tampon ADN polymerase 10X (Invitogen™)	5 µL
MgCl ₂ 50mM (Invitogen™)	1.5 µL
Amorces sens et antisens (10µM)	2µL
Taq Platinum (5 U/µL) (Invitrogen™)	0.5µL
H2O qsp	32µL

Tableau 14 : Mélange réactionnel utilisé pour les différentes PCR

Après mise au point et validation des différentes PCR sur l'ADN contrôle, les amplifications spécifiques de chaque gène ont été réalisées avec l'ADN complémentaire (ADNc) issu d'un panel commercialisé par la société BD Biosciences™. Le kit utilisé (Human MTC Panel II)™ contient des préparations d'ADNc produits à partir d'une rétro-transcription d'ARN de tissus splénique, thymique, prostatique, testiculaire, ovarien, de l'intestin grêle, du côlon, et des leucocytes. Leurs concentrations sont estimées à environ 1.0 ng/μL. La source d'ARN a été obtenue à partir de donneurs sains d'origine caucasienne, hommes et femmes d'âges compris entre 20 et 69 ans. Le niveau d'expression des différents transporteurs de zinc dans ces tissus humains pourra ensuite être analysé. L'amplification du gène β-actine ubiquitaire est indispensable pour normaliser la concentration des échantillons d'ADNc et pour pouvoir comparer de manière semi-quantitative l'expression tissulaire d'un gène candidat. Dans chaque tube, on ajoute à 45 μL du mélange réactionnel ci dessus, 5μL d'ADNc spécifique d'un tissu. Au total, on utilise 8 tubes par gène candidat pour l'étude de leur expression dans la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires, l'intestin grêle, le côlon et les leucocytes (Human MTC Panel II)™.

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur MJ research PTC 200™. On réalise une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, puis 35 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation spécifique des amorces pendant 30 secondes suivie d'une élongation à 72°C pendant également 30 secondes. Une élongation terminale est réalisée à 72°C pendant 10 min. La spécificité du produit de PCR est contrôlée par comparaison à un marqueur de taille (Boehringer Mannheim™). L'analyse de l'expression est semi-quantitative. Elle est validée par comparaison de l'expression du gène ubiquitaire β-actine amplifié au cours de la même réaction. Les différents produits sont analysés après électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2% coloré au bromure d'éthidium à partir d'une photographie prise sous lumière ultra-violette grâce à une caméra CCD (figures 12 à 15).

III-5. Séquençage des gènes candidats *hSLC39A1*, *hSLC39A5* et *DCT1*

La première étape du séquençage des gènes candidats consiste en l'amplification spécifique par réaction PCR des différents fragments à analyser grâce à des amorces spécifiques. Les conditions d'amplification varient en fonction des exons (tableaux 16, 18 et 20). On réalise une première étape de purification afin d'éliminer les dNTP et les amorces en excès à la suite de la réaction de PCR. La série des gels Sephadex™ est constituée d'un dérivé

du dextran qui permet de filtrer différemment des produits selon la granulométrie des billes du gel (ex : P-100, G-50, ...). Le gel Sephadex™ P-100 (AmershamPharmacia™) utilisé pour cette technique, est homogénéisé, puis est injecté à l'aide d'une seringue dans les puits de la microplaque à fond filtrant de 96 puits. On centrifuge, après équilibration des plaques, trois minutes à 1000 rpm. On change ensuite la microplaque inférieure « réceptacle » qui récupère l'excès de gel et on la remplace par une microplaque propre destinée à recevoir les produits de PCR purifiés. Dans cette optique, on charge les produits d'amplification bien au centre des puits (volume de 25 à 100µL) de la plaque et on centrifuge à nouveau 5 minutes à 1000 rpm. Un contrôle du produit purifié récupéré dans la microplaque inférieure est effectué sur minigel d'agarose (Ready to Run Amersham™).

La réaction de séquence à proprement parlé est ensuite effectuée. Elle met en jeu la technique du Dye Terminator™ qui est une adaptation de la technique de Sanger à la fluorescence. Cette réaction de séquence consiste en une synthèse *in vitro* d'ADN avec une incorporation aléatoire de didéoxynucléotides. La matrice est mise en contact avec un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase (AmpliTaq polymérase™), une amorce s'hybridant en 5' ou en 3' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de dNTP + ddNTP. Chaque didéoxynucleotide (ddNTP) porte un fluorochrome spécifique. Le ratio ddNTP/dNTP est de l'ordre de 1/100. Il existe donc 100 fois plus de chance d'incorporer un dNTP qu'un ddNTP. L'incorporation d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation (formation d'un fragment plus court que le fragment d'origine). La synthèse d'ADN est complémentaire de la matrice initiale : donc sur un brin de matrice, lorsqu'il existe un A, il va y avoir incorporation d'un ddTTP ou d'un ddTTP fluorescent. Si le fragment de PCR initial comporte 300A, comme la réaction est faite avec un très grand nombre de copie de la matrice, il y aura incorporation d'un ddATP à toutes les positions possibles (incorporation aléatoire). Il existera dans le tube, 300 fragments néosynthétisés, porteurs d'un ddTTP fluorescent et de taille différente. Cette réaction est effectuée simultanément avec les 4 ddNTP. Ainsi, pour un produit de 500 paires de bases, il y aura donc génération de 500 fragments fluorescents ne différant que d'une paire de base. Ces fragments néosynthétisés sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide, et après séparation électrophorétique, un laser vient exciter le fluorochrome ce qui permet d'identifier la base correspondante. Un tracé est finalement obtenu après analyse de l'ensemble des fragments générés. La réaction de séquence est effectuée sur les deux brins de l'ADN (réaction sens et anti-sens) : ceci permet de contrôler la présence d'une mutation au

niveau de l'ADN et donc de les différencier des erreurs effectuées par l'ADN polymérase utilisée lors de la réaction de séquence.

La réaction de séquence, identique pour les différents gènes candidats, se fait dans un volume de 20µL contenant par échantillon: 2µL de Big Dye Terminator™, 4µL de tampon 5X, 1µL de l'amorce spécifique (Cf. annexes : tableaux 26 à 28), un volume variable de produit PCR -entre 1 et 4 µL- selon le contrôle effectué sur minigel d'agarose (Ready to Run Amersham™) et le reste de volume complété par de l'eau stérile entre 8 et 12 µL (qsp 20µL). Le programme BigDye est effectué sur un PTC 200™ avec une dénaturation initiale à 96°C pendant une seconde puis 25 cycles comprenant 10 secondes à 96°C suivi de 5 secondes à 50°C et de 4 minutes à 60°C.

Après la réaction de séquence, une ultime étape de purification sur gel Sephadex™ G50 est effectuée suivant un protocole similaire à la première étape. On récupère ainsi, après une centrifugation de 4 minutes à 2000 tours par minute, les réactions de séquence dans la microplaque inférieure.

Les produits de séquence sont ensuite injectés dans l'automate dédié au séquençage utilisé au CHU de Nantes (Abi Prism™ 3100 Perkin-Elmer). Ils migrent grâce à une technique d'électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide (polymère utilisé POP6). Les différentes séquences sont ensuite analysées par bio-informatique avec le logiciel AutoAssembler™ commercialisé par la société Applied Biosystems™ et comparés avec des séquences de référence.

III-5.1. Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *hSLC39A5*

Après extraction à partir d'un prélèvement veineux sur tube EDTA, l'ensemble des 10 exons du gène humain *hSLC39A5* et de leurs régions introniques adjacentes a été amplifié à partir de l'ADN issu d'un témoin sain et des 14 patients atteints d'AE et inclus dans cette étude (tableau 26).

III-5.1.1. Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR

Réactifs PCR	Volume (μL)
Tampon réaction PCR (10X) Invitrogen™	5.0
MgCl ₂ -50mM Invitrogen™	1.5
dNTP (2,5 mM chaque)	4.0
Amorces F (10pmol/μL)	1.0
Amorces R (10 pmol/μL)	1.0
Taq Platinum (5U/μL) Invitrogen™	0.5
H2O stérile qsp 20μL	36.0
ADN génomique (100 ng/μL)	1.0

Tableau 15 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR de *hSLC39A5*

III-5.1.2. Conditions d'amplifications PCR

Etapas	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5'	1
Dénaturation	95°C	30''	
Hybridation des amorces	63°C (exons 1 et 8) 62°C (exons 2, 7 et 9) 58°C (exon 4) 57°C (exon 10)	30''	40
Extension	72°C	1'	
Extension finale	72°C	10'	1
Appareil PCR	PTC 200™		

Tableau 16 : Conditions d'amplifications PCR de *hSLC39A5*

III-5.2. Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *hSLC39A1*

A partir de l'ADN extrait des 14 patients inclus dans cette étude ainsi que d'un témoin sain, l'ensemble des 3 exons du gène humain *hSLC39A1* et de leurs régions introniques adjacentes a été amplifié (tableau 27).

III-5.2.1. Mélange réactionnel utilisé

Réactifs PCR	Volume (μL)
Tampon réaction PCR (10X) Invitrogen™	5.0
MgCl ₂ 50mM Invitrogen™	1.5
dNTP (2,5 mM chaque)	4.0
Amorces F (10pmol/μL)	1.0
Amorces R (10 pmol/μL)	1.0
Taq Platinum (5U/μL) Invitrogen™	0.5
H ₂ O stérile qsp 20μL	36.0
ADN génomique (100ng ng/μL)	1.0

Tableau 17 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR de *hSLC39A1*

III-5.2.2. Conditions d'amplification PCR

Etapas	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5'	1
Dénaturation	95°C	30''	
Hybridation des amorces	59°C (exon 1, 2, 3, 3')	30''	40
Extension	72°C	1'30''	
Extension finale	72°C	10'	1
Appareil PCR	PTC 200™		

Tableau 18 : Conditions d'amplifications PCR de *hSLC39A1*

III-5.3. **Caractéristiques et conditions d'amplification PCR des exons de *DCT1***

A partir de l'ADN extrait des 14 patients inclus dans cette étude ainsi que d'un témoin sain, l'ensemble des 16 exons du gène humain *DCT1* et de leurs régions introniques adjacentes a été amplifié (tableau 28).

III-5.3.1. Mélange réactionnel utilisé

Réactifs PCR	Volume (μL)
Tampon réaction PCR (10X) Invitrogen™	5.0
MgCl ₂ -50mM Invitrogen™	1.5
dNTP (2,5 mM chaque)	4.0
Amorces F (10pmol/μL)	1.0
Amorces R (10 pmol/μL)	1.0
Taq Platinum (5U/μL) Invitrogen™	0.5
H2O stérile qsp 20μL	36.0
ADN génomique (100 ng/μL)	1.0

Tableau 19 : Mélange réactionnel utilisé pour la réaction de PCR de *DCT1*

III-5.3.2. Conditions d'amplification PCR

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5'	1
Dénaturation	95°C	30''	
Hybridation des amorces	57°C (exons 1, 7, 8, 10 à 16) 59°C (exons 3, 5, 6 et 9) 61°C (exons 2 et 4)	30''	40
Extension	72°C	1'	
Extension finale	72°C	10'	1
Appareil PCR	PTC 200™		

Tableau 20 : Conditions d'amplifications PCR de *DCT1*

IV. RESULTATS

IV-1. Analyse par QM-PSF (Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments) du gène *hSLC39A4*

Le gène *hSLC39A4* (MIM: 607059) est composé de 12 exons et s'étend sur 4,5 kilo-bases. Il est localisé en 8q24.3. Nous avons analysé une série de 14 patients atteints d'AE clinique. Certains d'entre eux ne présentaient aucune mutation du gène *hSLC39A4*. Pour les autres, le séquençage a mis en évidence des mutations ponctuelles ou des petites délétions à l'état hétérozygote.

Nous avons, dans un premier temps, analysé une série de huit ADN témoins, extraits de personnes non atteintes d'AE pour vérifier la validité de la QM-PSF. Puis, la technique que nous avons mise au point a permis de confirmer en analysant l'ensemble des patients inclus, deux réarrangements de petite taille déjà détectés par séquençage. Une délétion de 5 paires de bases (c.1223_1227delCCGGG) a pu être mise en évidence dans l'exon 7 pour le patient 7 (Figure 4). La deuxième délétion que l'on retrouve dans la PCR multiplexe 4 concerne l'exon 4. Il s'agit de la délétion d'une paire de bases entraînant un décalage du cadre de lecture : c.763delC. Elle concerne le patient 11 (Figure 7). Le reste des patients étudiés par QM-PSF sur l'ensemble des 12 exons ne présentaient pas d'exons délétés ou dupliqués (Figures 3 et 6). Ces résultats permettent de confirmer la sensibilité de la QM-PSF, avec la mise en évidence de micro-réarrangements comme ceux décrits ci-dessus.

Secondairement, nous avons étudié la partie promotrice du gène sur une distance d'environ 5 kilo-bases en amont de l'exon 1. Cette région a été divisée arbitrairement en cinq fragments d'environ 1 kilo-base. Cette analyse a permis de mettre en évidence chez deux patients (n°4 et n°5) un profil délété pour les fragments 1 (Figure 11) et 2 (Figure 9). Il s'agit de la partie en 5' s'étendant de 3 à 5 kilo-bases en amont de l'exon 1 du gène *hSLC39A4*. Ce résultat a été confirmé par une deuxième analyse effectuée sur ces mêmes échantillons. En revanche, les autres patients recrutés pour cette étude ne présentaient pas de profils anormaux pour cette région (Figures 8 et 10).

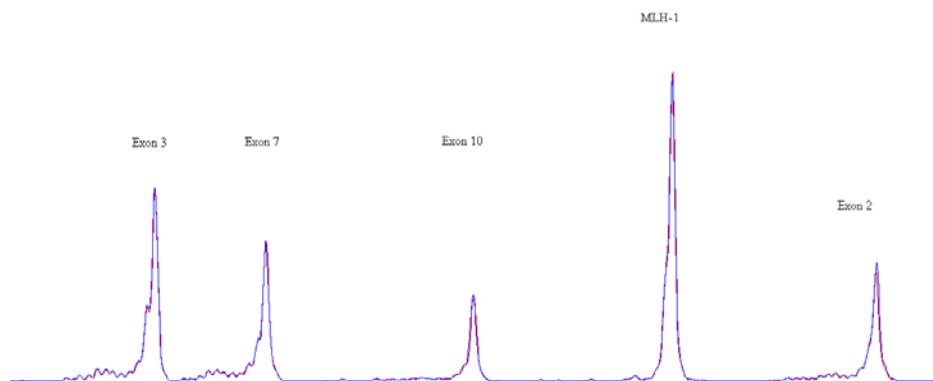


Figure 3 : Profil normal de la PCR multiplexe 1 : patient non délété

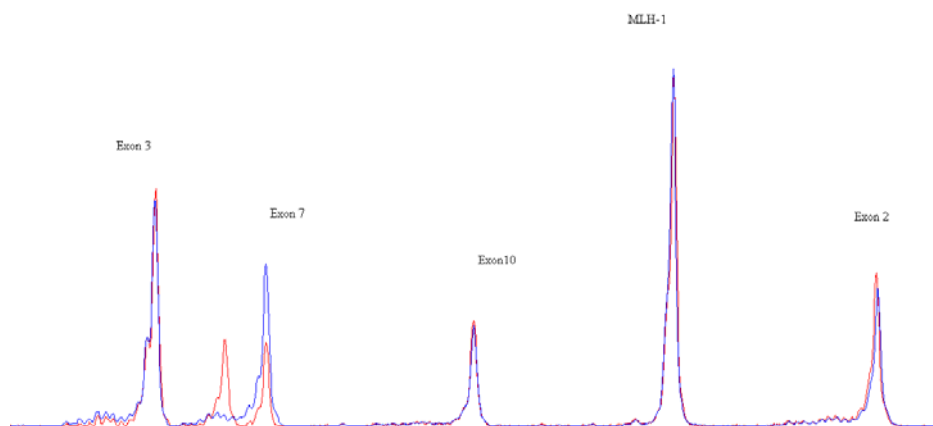


Figure 4 : c.1223_1227delCCGGG en rouge à l'état hétérozygote dans l'exon 7 : patient 7

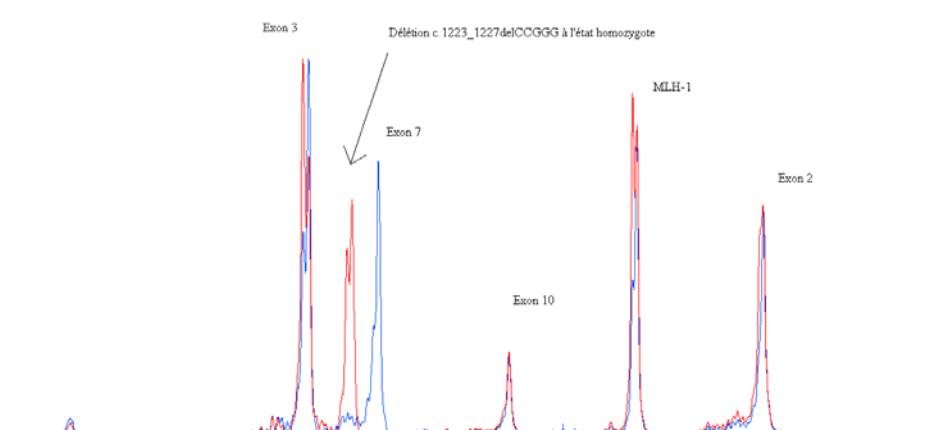


Figure 5 : c.1223_1227delCCGGG à l'état homozygote (patient hors inclusion)

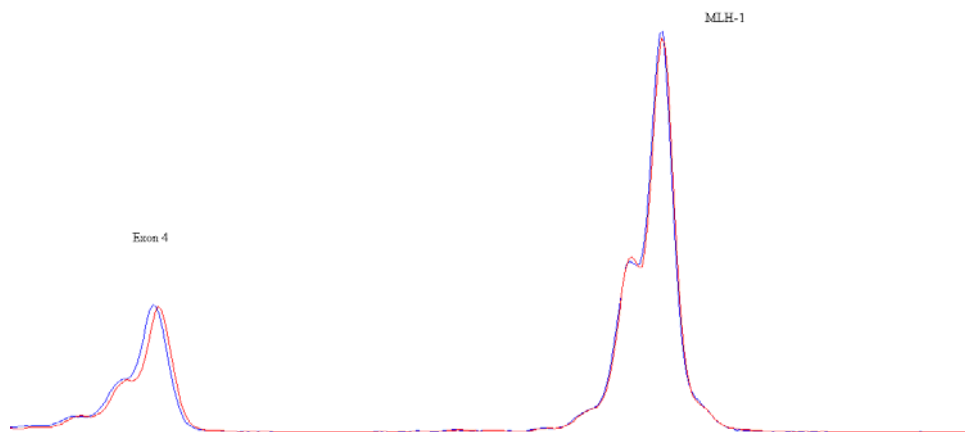


Figure 6 : Profil normal de la PCR multiplexe 4 : patient non délété

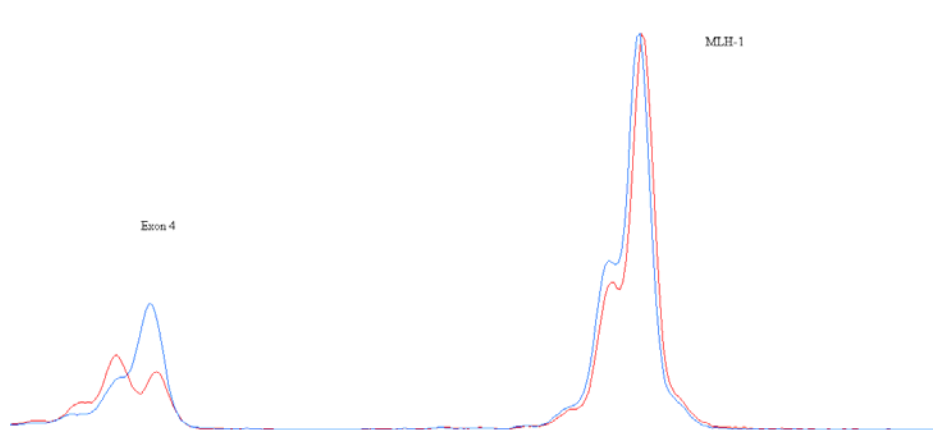


Figure 7 : c.763delC en rouge à l'état hétérozygote dans l'exon 4 : patient 11

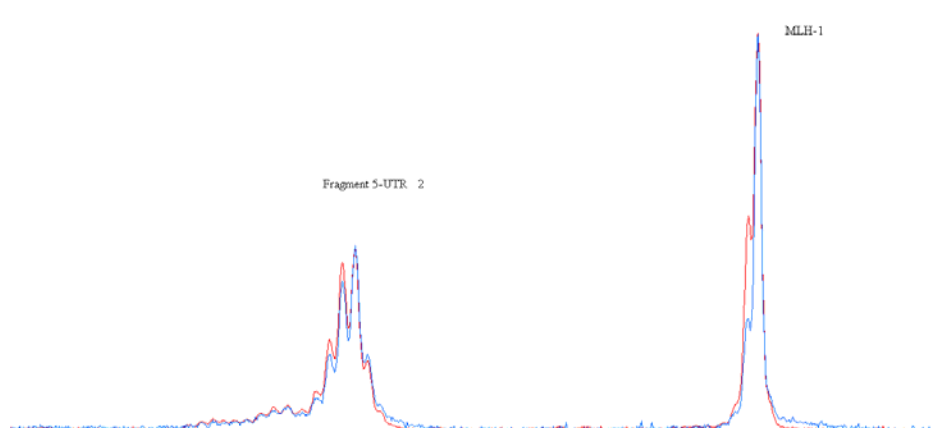


Figure 8 : Profil normal du fragment 5UTR-2 du promoteur : patient non délété

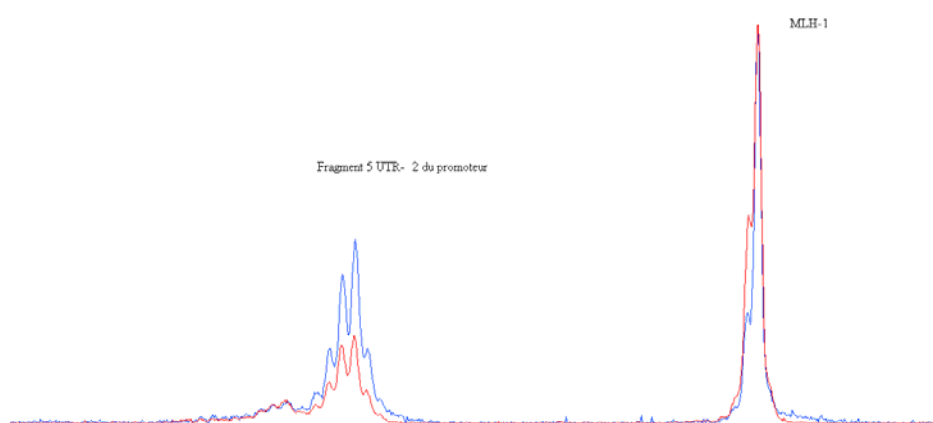


Figure 9 : Délétion en rouge du fragment 5UTR-2 du promoteur : patients 4 et 5

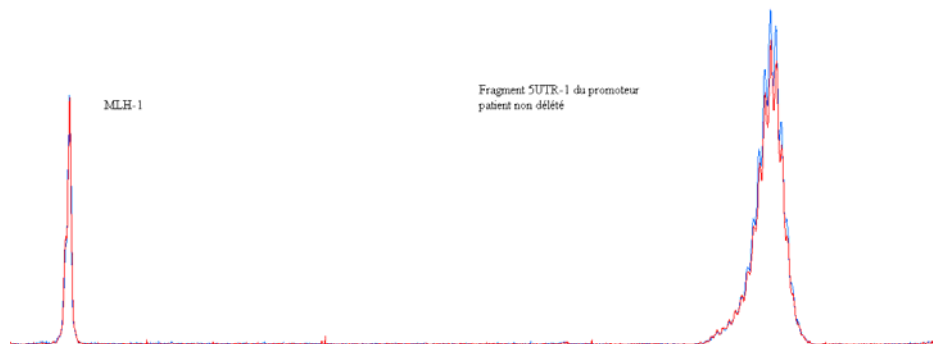


Figure 10 : Profil normal du fragment 5UTR-1 du promoteur : patient non délété



Figure 11 : Délétion en rouge du fragment 5UTR-1 du promoteur : patients 4 et 5

IV-2. Etude d'expression des différents gènes du transport de zinc

L'expression tissulaire a pu être établie grâce à l'utilisation d'un panel commercialisé (Clontech™) comprenant huit ADNc issus de tissus humains variés (rate, thymus, prostate, testicule, ovaire, intestin grêle, côlon et leucocytes). Des protocoles d'amplification par PCR utilisant des amorces spécifiques des différents gènes ont été élaborés. Un gène ubiquitaire codant pour la β -actine a été également co-amplifié comme témoin interne. Nous nous sommes d'abord focalisés sur les gènes de la famille *hSLC30A* non décrits dans la littérature.

Ainsi, l'amplification spécifique par PCR du gène *hSLC30A6* a révélé une expression ubiquitaire, avec cependant une expression colique sensiblement supérieure. Ces résultats sont concordants, du moins pour les tissus étudiés, avec les dernières données de la littérature [62]. De même, *hSLC30A7* est présent dans les différents tissus testés mais à des niveaux plus faibles. L'utilisation de ce panel d'ADNc humain n'a pas permis de déterminer d'expression du gène *hSLC30A8* parmi les tissus testés. Cependant, très récemment une équipe a identifié une expression abondante de la protéine correspondante au gène *hSLC30A8* dans le pancréas [67]. Enfin, le gène *hSLC30A9* présente une expression relativement faible parmi les différents tissus testés mais avec une prédominance dans les testicules. A ce jour, aucune donnée bibliographique n'existe pour confirmer ou infirmer ce résultat.

En parallèle, nous avons procédé de la même manière pour la famille des gènes *hSLC39A*. Le premier gène étudié *hSLC39A1* révèle une expression ubiquitaire mais nettement plus importante au niveau de l'intestin grêle et des ovaires (Figure 12).

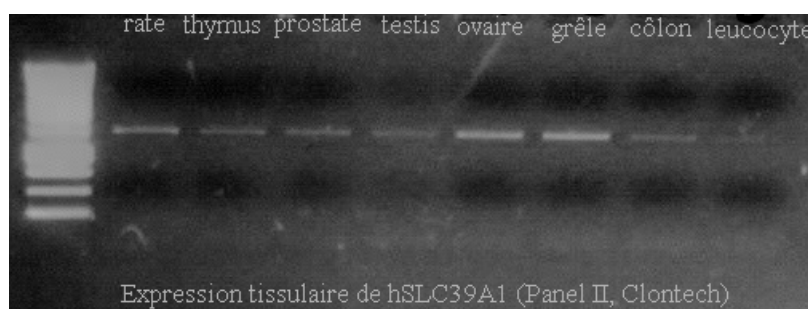


Figure 12 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A1*

L'étude du gène *hSLC39A6* a montré une expression très faible au niveau des tissus étudiés ne permettant pas de conclusion pour ce transporteur. La distribution de *hSLC39A7* analysée

secondairement semble ubiquitaire avec une expression plus marquée dans la prostate et le côlon (Figure 13).

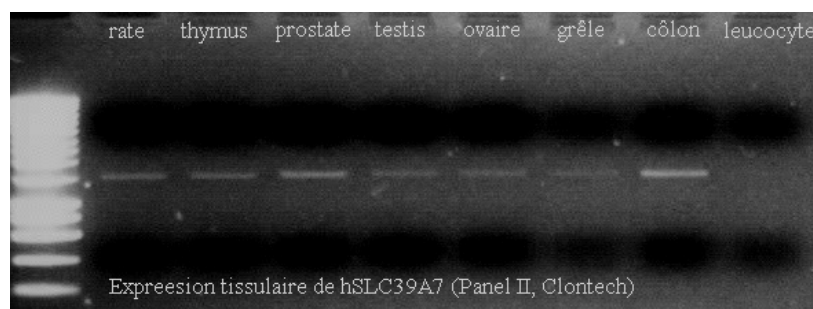


Figure 13 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A7*

L'amplification par PCR du gène *hSLC39A9* a révélé également une expression large du transcrit à l'exception de l'intestin grêle où elle est non détectable (Figure 14). Le gène *hSLC39A11* est exprimé très faiblement au niveau des tissus étudiés, cependant on note pour la rate, la prostate et le côlon un taux légèrement supérieur.



Figure 14 : Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A9*

Enfin, les derniers gènes analysés, *hSLC39A13* et *hSLC39A14*, présentent aussi une expression ubiquitaire parmi les différents tissus compris dans le panel Clontech™, avec pour le gène *hSLC39A14* un niveau d'expression supérieur dans les testicules.



Figure 15: Révélation sur gel d'agarose à 1.2% de l'expression tissulaire du gène *hSLC39A13*

	ZnT6	ZnT7	ZnT8	ZnT9
Expression Tissulaire (Panel II Clontech™)	ubiquitaire colique++	ubiquitaire faible	absente	faible testicule++

Tableau 21 : expression tissulaire des gènes *hSLC30A6*, 7, 8 et 9 (Panel II Clontech™)

	ZiP1	ZiP6	ZiP7	ZiP9	ZiP11	ZiP13	ZiP14
Expression Tissulaire Panel II Clontech™	ubiquitaire intestin grêle+++	faible	ubiquitaire prostate, côlon ++	expression large grêle -	faible	ubiquitaire	ubiquitaire testicule++

Tableau 22 : expression tissulaire des gènes *hSLC39A1*, 6, 7, 9, 11, 13 et 14 (Panel II Clontech™)

IV-3. Analyse mutationnelle du gène *hSLC39A5*

En partant du matériel génomique des individus AE inclus dans cette étude, nous avons amplifié par PCR l'intégralité des régions codantes de *hSLC39A5* correspondant à 10 exons (tableaux 15, 16 et 26). Les fragments amplifiés ont tous été systématiquement séquencés et comparés à des séquences de référence (www.ensembl.org) déduites de l'ADN génomique d'individus sains et sans aucun lien de parenté avec les familles à AE. Après vérification des séquences relatives à chaque individu, aucune mutation n'a pu être trouvée dans les exons de *hSLC39A5* ou de leurs régions flanquantes qui pourrait conduire à la synthèse d'une protéine déficiente, soit par substitution d'acides aminés, soit par altération du

phénomène d'épissage. En outre, nous n'avons trouvé aucun polymorphisme dans la séquence codante des individus testés.

IV-4. Analyse mutationnelle du gène *hSLC39A1*

Le gène *hSLC39A5* exclu, nous nous sommes intéressés aux autres transporteurs spécifiques du zinc connus dont l'expression tissulaire paraissait compatible avec une participation dans la physiopathologie de l'AE. Dans cette optique, nous avons décidé d'étudier le gène *hSLC39A1* qui semblait répondre à ces critères de par sa localisation tissulaire et son rôle central dans le maintien de l'homéostasie du métal. En déterminant les jonctions entre les trois exons de *hSLC39A1* et de leurs régions bordantes ou introniques (Cf.annexes : tableau 27), nous avons pu mettre au point des protocoles d'amplification par PCR pour toute la région codante du gène, ainsi que pour les zones d'épissages (tableaux 17 et 18). Au moyen de ces amplifications PCR, nous avons ensuite criblé toutes les mutations éventuelles de *hSLC39A1* chez les 14 patients AE recrutés pour cette étude.

Après vérification des séquences relatives à chaque individu, aucune mutation n'a pu être trouvée dans les exons de *hSLC39A1* ou de leurs régions flanquantes. De même, comme pour *hSLC39A5*, nous n'avons pas trouvé de polymorphismes dans la séquence codante des individus testés.

IV-5. Analyse mutationnelle du gène *DCT1*

Bien que *DCT1* soit très différent des autres transporteurs de zinc connus, sa capacité à transporter ce métal est particulièrement efficace. En déterminant les jonctions entre les 16 exons de *DCT1* et leurs régions bordantes ou introniques (Cf.annexes : tableau 28), nous avons pu mettre au point des protocoles d'amplification par PCR pour toute la région codante du gène, ainsi que pour les zones d'épissages (tableaux 18 et 19). Au moyen de ces amplifications PCR, nous avons ensuite criblé toutes les mutations éventuelles du gène *DCT1* chez les 14 patients AE recrutés pour cette étude.

Après vérification des séquences relatives à chaque individu, aucune mutation n'a pu être trouvée dans les exons de *DCT1* ou de leurs régions flanquantes. Ainsi, l'implication de ce transporteur dans la physiopathologie de l'acrodermatite entéropathique a pu être complètement écartée par ces résultats.

V. DISCUSSION

Pour étudier un second mécanisme moléculaire impliqué dans l'acrodermatite entéropathique, nous avons décidé dans un premier temps, de compléter l'analyse du gène *hSLC39A4* en recherchant la présence de grands réarrangements (duplications, délétions). Cette hypothèse, qui n'avait pas été encore exploitée, était tout à fait envisageable sachant qu'un cas avait déjà été signalé dans la littérature [9]. Ainsi, une délétion localisée à 3 kilo-bases en amont du premier exon et d'une taille d'environ 2 kilo-bases avait été détectée chez un patient français en 2002, par *Southern-blot* [9]. Cependant, les auteurs n'avaient à l'époque qu'évoqué leurs résultats, sans véritablement les détailler. Ce cas publié nous a conduit à rechercher d'abord ce type d'anomalies moléculaires.

Le *Southern-blot* a été la méthode de référence dans ce type de recherches pendant de nombreuses années, mais elle a été depuis supplantée par la PCR quantitative. Il nous a donc paru opportun de développer une technique de biologie moléculaire semi-quantitative adaptée (QM-PSF). De manière générale, les grands réarrangements sont impliqués dans différentes maladies génétiques comme l' α -thalassémie, la myopathie de Duchenne mais également dans des formes de cancer coliques familiaux de type HNPCC pour *hereditary non polyposis colorectal cancer* (gène *MSH2*) ou de cancers du sein (gènes *BRCA1* et *BRCA2*). En se référant à la base de données des gènes humains datant de mai 2000, on constate que les délétions et les duplications représentent 5.5 % des mutations reportées [81]. Mais ces chiffres ont certainement été sous-estimés, sachant que les techniques utilisées jusqu'à récemment n'incluent pas forcément la détection de ces réarrangements. Il n'était donc pas à exclure que le gène *hSLC39A4* puisse présenter ce type de mutations.

Parmi les patients sélectionnés pour cette étude, nous n'avons pas mis en évidence de grands réarrangements dans la séquence codante du gène. Cependant, nous avons pu confirmer la présence de petites délétions déjà décrites (c.1223_1227delCCGGG et c.763delC) dans les exons 4 et 7. Ces résultats nous auront en tout cas permis de valider la robustesse et la sensibilité de cette technique. Contrairement à la partie codante, nous avons retrouvé pour deux patients un profil de délétion dans la région située à environ 4 kilo-bases du premier exon et sur une longueur bornée entre 2 et 3 kilo-bases. Ce résultat, de par sa localisation, ressemble au premier cas décrit dans la littérature par *Southern-Blot*.

La région située en amont du premier exon correspond au promoteur du gène. Le promoteur est constitué d'une série de courtes séquences conservées, localisées à une distance relativement constante du site d'initiation de la transcription. C'est une région nécessaire pour une transcription quantitativement et qualitativement normale car elle permet la liaison de facteurs de transcriptions qui interagissent avec l'ARN polymérase. Des activateurs ou

« enhancers » sont localisés en amont du promoteur. Ce sont des éléments de régulation positive dont les fonctions, contrairement à celles de promoteur, sont indépendantes de l'orientation et, dans une certaine mesure, de leur distance par rapport aux gènes qu'ils contrôlent. Ils sont localisés à une distance variable allant jusqu'à quelques kilo-bases en amont du site d'initiation de la transcription. Ils contiennent souvent, sur un intervalle de 200 à 300 paires de bases, des éléments reconnus par des facteurs de transcription ubiquitaires, mais aussi des éléments reconnus par des facteurs de transcription tissu-spécifiques. Les « enhancers » permettent ainsi d'augmenter le niveau de la transcription qui est initié par les éléments promoteurs. On les retrouve dans une grande variété de gènes humains. Ces séquences, qui peuvent être très éloignées sont difficiles à mettre en évidence et à délimiter de manière précise, en particulier dans la région d'intérêt du gène *hSLC39A4*.

Les conséquences d'une délétion dans cette région sont délicates à déterminer. Cependant, il est possible qu'un réarrangement dans cette zone puisse avoir des répercussions sur l'activité transcriptionnelle du gène *hSLC39A4* et donc sur l'absorption intestinale du zinc. Il n'est donc pas à exclure que la délétion décrite à environ 4 kilobases du premier exon puisse entraîner une baisse du niveau de transcrits d'ARNm et donc de protéines hZIP4 au niveau de la bordure en brosse de l'entérocyte. Il est bien entendu que cela reste une hypothèse qui pourrait théoriquement être confirmée par une biopsie intestinale chez ces patients. En effet, cet examen invasif permettrait de réaliser, à partir d'extraits de duodénum et/ou de jéjunum des patients atteints d'AE, une Q-RT-PCR (Quantitative RT-PCR) ou un *northern-blot* spécifiques du gène *hSLC39A4*, afin de déterminer la quantité de transcrits exprimés chez un malade par rapport à un témoin sain. Cependant, ceci restera théorique sachant qu'une biopsie intestinale chez ces patients ainsi que chez des volontaires sains reste contraire à l'éthique médicale. En effet, ce geste invasif n'est pas justifié d'un point de vue médical dans le cadre d'une AE, sachant qu'un traitement bien conduit par voie orale par gluconate de zinc suffit à la rémission complète des symptômes.

L'existence d'un ou plusieurs gènes ayant une action complémentaire dans l'absorption intestinale du zinc devait être envisagée pour les patients dont le diagnostic moléculaire n'avait rien donné. Nous nous sommes donc tournés vers une stratégie dite du « gène candidat » qui, bien que présentant quelques faiblesses, semblait être la seule solution adaptée compte tenu de notre recrutement souvent limité au cas index dans la famille.

L'AE est due à un défaut d'absorption intestinale du zinc, comme l'indiquaient les expériences de radioactivité dirigées sur l'intestin grêle d'individus à AE [5]. Le principal gène impliqué dans la pathologie, *hSLC39A4*, possède une expression, par *northern-blot*,

limitée au rein et à l'intestin grêle [8]. Ce gène joue un rôle primordial dans l'homéostasie du zinc car le rein et l'intestin grêle sont justement deux des organes de régulation homéostatique principaux de l'organisme ; d'autre part, dans l'intestin, le gène *hSLC39A4* est principalement exprimé dans le duodénum et le jéjunum, deux sites privilégiés d'absorption intestinale du zinc. Puisque, chez les individus à AE, les mécanismes de régulations homéostatiques sont dépassés et l'absorption intestinale est considérablement réduite, nous avons orienté nos recherches vers un gène candidat codant pour une protéine dont la fonction et la localisation sont proches de la protéine hZiP4. L'existence d'un second transporteur dédié à l'absorption du zinc, complémentaire de hZiP4, a été un temps suggéré, d'une part, par analogie aux transporteurs Zrt1 et Zrt2 de la levure et, d'autre part, par le constat que les patients présentant une AE étaient traités avec succès par une prise orale de zinc, ce qui pouvait impliquer l'existence d'un second transporteur intestinal.

Le premier gène que nous avons testé, *hSLC39A5*, membre de la sous-famille LIV-1, avait dès 2002 intrigué l'équipe américaine dirigée par Wang [8]. En effet, ils évoquaient déjà l'action complémentaire de ce second transporteur de zinc vis-à-vis de hZiP4. Dénommé alors, hORF1, il semblait être un candidat sérieux dans l'absorption intestinale du zinc, de par sa localisation. Étudié plus en détail très récemment, il présente une séquence très proche de son homologue murin (84% d'identité) et également des gènes *SLC39A4* humain et murin. Après analyse bio-informatique, les protéines hZiP4 et hZiP5 se sont révélées identiques pour environ 30%. L'expression de *hSLC39A5* déterminée par *northern-blot*, est plus importante dans l'intestin grêle, le côlon, le foie, le rein, et le pancréas. Ce même profil d'expression tissulaire avait déjà été décrit pour les transcrits de *hSLC39A4*. Les protéines hZiP4 et hZiP5 sont donc des transporteurs très proches, de par leurs structures et leurs profils d'expression tissulaire [70]. L'ensemble de ces données bibliographiques nous a incité à nous intéresser en priorité à ce gène. A priori, la fonction et l'expression, notamment au niveau intestinal, de la protéine hZiP5 faisaient du gène *hSLC39A5* un excellent candidat. Mais, comme l'atteste l'ensemble de nos résultats, nous n'avons pas identifié, après séquençage systématique de l'ensemble de la région codante et des jonctions exons-introns de ce gène, de mutations pour les 14 patients inclus dans cette étude.

Bien que ces résultats négatifs n'étaient pas ceux escomptés, ils semblent aller dans le même sens que les données publiées ces dernières semaines dans la littérature. En effet, bien que par prédiction bio-informatique, la protéine hZiP5 puisse être localisée sur la membrane apicale de l'entérocyte, aucune protéine ZiP5 n'a été détectée expérimentalement à ce niveau chez la souris [70]. Ainsi, par technique immunohistochimique, la protéine murine mZiP5 a

été située sur la membrane baso-latérale de cellules polarisées MDCK et cette localisation a été confirmée *in situ* sur des cellules intestinales d'origine murine. D'autre part et contrairement à hZiP4 dont l'expression au niveau de la membrane est induite pendant les périodes de carence en zinc, l'expression de hZiP5 n'est pas modifiée à ce niveau par le statut du métal et la protéine hZiP5 serait plutôt internalisée au cours d'un déficit en zinc [82]. Ainsi, même si un temps Wang, K. et al., [9] ont pensé que la protéine hZiP5 pouvait intervenir comme transporteur accessoire au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte, la découverte d'une localisation différente au niveau de la cellule intestinale a infirmé cette hypothèse. Depuis, ces auteurs émettent deux hypothèses : la protéine murine mZiP5 pourrait « approvisionner » la cellule intestinale en zinc lorsque l'apport alimentaire est faible, mais elle pourrait également intervenir dans la régulation homéostatique du zinc en permettant le transport du métal en excès vers la lumière intestinale. C'est cette hypothèse qui est privilégiée actuellement par les auteurs, du fait de l'absence de régulation négative du transporteur au cours d'un traitement par zinc. Enfin et surtout, l'équipe dirigée par Wang, K, qui avait la première suggérée que des mutations de hSLC39A5 eussent pu être retrouvées chez certains patients porteurs d'AE sans atteinte de hSLC39A4, a révélé très récemment que l'analyse de leurs patients par séquençage de hSLC39A5 avait été infructueuse. Au vu de nos résultats et de l'apport supplémentaire de ces données bibliographiques, il nous paraît raisonnable d'exclure définitivement un rôle de hSLC39A5 dans l'AE. En fait, on s'oriente plutôt à l'heure actuelle vers un rôle antagoniste de hZiP5 par rapport à hZiP4 dans la régulation homéostatique du zinc [82].

Le second gène étudié, *hSLC39A1*, nous semblait également intéressant de par les premiers résultats obtenus au niveau de son expression tissulaire. En effet, nous avons identifié une expression ubiquitaire mais nettement plus importante au niveau de l'intestin grêle et des ovaires. Les données propres à cette étude étaient cohérentes avec la bibliographie concernant ce transporteur qui concluait à une distribution large de la protéine hZiP1 au niveau de différents organes et glandes, comprenant l'intestin grêle et le pancréas. Ainsi, la localisation ubiquitaire de hZiP1 révélant un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du métal en faisait également un candidat de choix [69]. Après vérification des séquences relatives à chaque individu, aucune mutation n'a pu être trouvée dans les exons de *hSLC39A1* ou dans leurs régions flanquantes. Ce résultat négatif nous a conduit à exclure également ce second gène candidat de notre étude.

Le dernier gène candidat *DCT1* a été inclus dans cette étude par sa propriété à transporter des cations divalents. Bien que *DCT1* soit très différent des autres transporteurs de

zinc connus, sa capacité à transporter ce métal est particulièrement efficace. Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette étude, ce transporteur de cations divalents est principalement responsable de l'absorption du fer alimentaire depuis la lumière duodénale vers le cytoplasme des cellules épithéliales intestinales. Mais il contribue également à l'absorption intestinale du zinc en association avec le fer. Dans une même démarche d'approche « gène candidat », nous avons donc décidé d'étudier *DCT1*. Cependant, le choix de ce gène arrivait en seconde ligne, sachant que la protéine codée par *DCT1* transporte un grand nombre de cations divalents : Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Pb^{2+} .

Néanmoins, il nous a paru intéressant de l'étudier de par sa localisation intestinale et sa capacité à absorber du zinc. Le résultat normal du séquençage du gène *DCT1* pour les patients inclus dans cette thèse aura permis d'écarter également ce gène candidat. Ce résultat semble plus logique sachant qu'un défaut dans la fonction de ce transporteur devrait certainement avoir des conséquences cliniques multiples liées au déficit d'absorption de plusieurs oligo-éléments, ce qu'aucunes observations cliniques ne mentionnaient parmi les patients recrutés, à moins d'une mutation altérant spécifiquement la fixation du zinc.

Au total, les analyses mutationnelles auront permis d'écarter toute participation des gènes *hSLC39A1*, *hSLC39A5* et *DCT1* dans l'AE des patients inclus dans cette étude. Mais au terme de cette thèse, l'existence d'un second locus lié à l'AE ne peut pas être exclue. Dans le choix de gènes candidats, nous avons envisagé dans notre modèle pathogénique simplifié un second gène ayant des propriétés proches de *hSLC39A4* et appartenant à l'une des familles de gènes transporteur du zinc connu. Or, il n'est pas à exclure que le phénomène d'absorption intestinale soit beaucoup plus complexe que prévu, fait de nombreuses interactions et coopérations moléculaires. Cette éventualité multiplie les candidats possibles. Ainsi, un gène pourrait intervenir dans la pathogénie de l'AE en codant pour une molécule intervenant en amont ou en aval du transporteur membranaire strict. Dans ce cas, l'approche gènes candidats n'est plus adaptée et l'orientation vers une méthode de cartographie d'homozygotie permettrait de répondre à cette question à condition de présenter un recrutement de familles informatives suffisant. Le recours à des puces à ADN de génotypage (puces SNPs), bien que d'un coût non négligeable, serait une alternative séduisante à la technique « classique » de cartographie d'homozygotie car elles nécessitent très peu de patients et de familles.

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude aura eu pour finalité d'améliorer le diagnostic de cette pathologie génétique en permettant la recherche de grands réarrangements dans le gène *hSLC39A4*. La technique de QM-PSF mise au point pourra donc être utilisée en seconde intention dans le cas où la recherche de mutations ponctuelles par séquençage direct du gène serait négative. Parmi les patients inclus, nous n'avons pas mis en évidence de grandes délétions ou duplications concernant la partie codante. Cependant, ce résultat ne rend pas cette technique inutile. En effet, dans l'avenir, il n'est pas à exclure que parmi les patients atteints d'acrodermatite entéropathique et analysés en « routine » au laboratoire nous mettions en évidence, par cette technique, un grand réarrangement.

En marge de l'étude de la partie codante, ce travail aura permis de montrer une anomalie moléculaire dans la partie régulatrice du gène. Cependant, l'implication de cette délétion dans l'AE sera très difficile à démontrer de manière formelle pour les raisons évoquées dans la partie discussion. La technique mise au point dans cette partie du génome pourra en tout cas être exploitée en dernière intention dans le cas d'un diagnostic moléculaire rendu négatif. Des résultats identiques aux deux cas décrits dans cette thèse pourraient alors renforcer l'hypothèse qu'une anomalie moléculaire dans cette région favorise une baisse de la transcription du gène *hSLC39A4* et par conséquent une diminution de l'absorption intestinale du zinc.

En parallèle, l'objectif de déterminer un second gène impliqué dans la physiopathologie de l'AE n'a pas été atteint. Même si le choix des candidats à l'heure actuelle était justifié par des données objectives résultants de nos travaux et des publications récentes, nous n'aurons pas pu déterminer d'anomalies moléculaires dans la séquence de ces gènes. Cependant, ce travail aura permis de faire la synthèse de l'ensemble des gènes transporteurs du zinc connu en 2005, d'apporter des données complémentaires liées à l'expression tissulaire ou de confirmer certaines données bibliographiques. Enfin, cette approche gène candidat aura permis d'exclure trois gènes potentiellement associés à l'AE.

Dans le cas particulier de cette étude, nous étions limité dans notre choix à l'approche « gène candidat ». Comme nous venons de le voir, cette approche n'était pas idéale et comportait un risque d'échec. A l'heure actuelle, nous ne pouvons pas exclure un second locus génétique lié à l'AE. Des perspectives pourraient être envisagées dans ce sens en collaborant étroitement avec des cliniciens sensibilisés à cette pathologie rare. Le travail du clinicien consisterait en un recrutement de familles informatives dont certains membres

malades ne présenteraient pas de mutations ou une mutation à l'état hétérozygote après séquençage direct et recherche de grands réarrangements dans le gène *hSLC39A4*.

L'idéal pour mener à terme ce projet serait de posséder des échantillons ADN provenant de plusieurs familles à AE, si possible faiblement consanguines (une ou deux unions consanguines au plus) incluant au moins une grande famille avec plusieurs individus malades. Dans ce cas, nous pourrions envisager une stratégie de cartographie par homozygotie, méthode variante de l'analyse de liaisons génétiques bien plus adaptée au mode de transmission autosomique récessif de ce syndrome.

ANNEXES

	Amorce	Taille de l'amplicon
EX1-F	cgttagatagCTGGTCTCGCTGGAGCTG	168 paires de bases
EX1-R	gatagggttagGTCCGCCAGCGTATTTAACA	
EX2-F	cgttagatagAGTGCCTGTCTGTGGAGGA	205 paires de bases
EX2-R	gatagggttagGAGGTGGTCTGCATGAGAGG	
EX3-F	cgttagatagTGCTGGACCATGTCAGGAG	118 paires de bases
EX3-R	gatagggttagATAGGGACCTCGCTGCTGT	
EX4-F	cgttagatagCAACTCTTCTCCCTGCCAGA	169 paires de bases
EX4-R	gatagggttagACACACTGGAGCTGTTGCTG	
EX5-F	cgttagatagTGATGGCTGCATATGGACTG	133 paires de bases
EX5-R	gatagggttagCTGGACTGGGAGGTGCAG	
EX6-F	cgttagatagACGCTGCTCATCTGCCTCT	121 paires de bases
EX6-R	gatagggttagCCAGGCTCAGGAAGGTCTG	
EX7-F	cgttagatagGCATACACACAGCGAAGAGG	131 paires de bases
EX7-R	gatagggttagGCAGCAGGAGATTGAAGAGG	
EX8-F	cgttagatagTGGACACTGAGCACCTACCC	118 paires de bases
EX8-R	gatagggttagCAGCTGCAGGGACACACC	
EX9-F	cgttagatagGGGACTTACTCAAGGCTCCTC	150 paires de bases
EX9-R	gatagggttagCCACACAAACCCAGATCC	
EX10-F	cgttagatagTTGAGGCTACTGCCCTATATGA	157 paires de bases
EX10-R	gatagggttagGCAACTCGTGGCAGAACAC	
EX11-F	cgttagatagAGGGCGGAGCTGTTAATGT	293 paires de bases
EX11-R	gatagggttagTCAGCTCCTCTGCTCAGCTC	
EX12-F	cgttagatagCGGCGATGTTGAAAGTACG	127 paires de bases
EX12-R	gatagggttagATCCTCGTACAGGGACAGCA	
MLH1-14F	cgttagatagATTTTTTGTTCAGTTCTCC	181 paires de bases
MLH1-14R	gatagggttagTAGTAGCTCTGCTTGTTCACACA	
5UTR-1F	cgttagatagCTTGGCGTCCCAAAGTATTG	313 paires de bases
5UTR-1R	gatagggttagCCTGGGTGGCAGAGAGAG	
5UTR-2F	cgttagatagGCCTCCCAGGTTCAAGAGTC	148 paires de bases
5UTR-2R	gatagggttagCCTGGCCAACATAGCAAGAC	
5UTR-3F	cgttagatagGCCTCCCAAACCCTTTAC	152 paires de bases
5UTR-3R	gatagggttagATGCACCTGGAGGAGACTGT	
5UTR-4F	cgttagatagACATGAATGGAGGGAATGGA	132 paires de bases
5UTR-4R	gatagggttagTTAGCTTCTGGGCAAAGGTC	
5UTR-5F	cgttagatagCAGCAAGAGCAAACTCCAA	148 paires de bases
5UTR-5R	gatagggttagCATCCAGTGGCAGATCCTC	

Tableau 23 : Séquences des amorces utilisées en QMPSF et tailles des produits d'amplification

Séquence de l'amorce		Taille en pb	Tm d'hybridation
ZnT6-ADNcF ZnT6-ADNcR	ACACACACCTTACAGCAGCA AGTGGCAGAGCAAGACTCC	504 pb	63°C
ZnT7-ADNcF ZnT7-ADNcR	GTCTGTCTGTGTCTCGCAGC CTTGGGTGGTTTGTATTCATCG	164 pb	63°C
ZnT8-ADNcF ZnT8-ADNcR	CACATTGCTGGGAGTCTTGC ATCATCACAGTCGCCTGGA	259 pb	58°C
ZnT9-ADNcF ZnT9-ADNcR	TCGGTGTTCGCTGATGTCC CGGTCGCTGGGATTACAGG	445 pb	63°C
ZIP1-ARNF1 ZIP1-ARNR1	GTCGTGGGTCTGAGAGTCACTGG CAGGGTGCTGAAATGGGCTAGG	1431pb	68°C
ZIP6-ARNF1 ZIP6-ARNR1	ATTTCTCGAAGACACCAGTGGG GCATACAACTCATCTCCCTATGACC	2416 pb	70°C
ZIP7-ARNF1 ZIP7-ARNR1	GCGATTGGAGTAAAGCGGACCC ATGATAACTCCCCCAGCAGCC	1462 pb	65°C
ZIP9-ARNF1 ZIP9-ARNR1	AGTGGTTGTGGGTGAATAAAGGAGGG TGTTCTCACTGGATGGCAAACGG	1005 pb	70°C
ZIP11-ARNF1 ZIP11-ARNR1	GGCGAGAGAGTGGCAGCGG GGCGGATGAGAGGTGTGCTGG	1507 pb	64°C
ZIP12-ADNc F ZIP12-ADNcR	TTCAAACACAACGACCCTGG TGATTTTACTCCAACAGGCATCTG	445 pb	63°C
ZIP13-ADNcF ZIP13-ADNcR	GCTGCTTCTGCTCTGTGCGG AGTGCTGAGTGGGGCTGGG	601 pb	63°C
ZIP14-ADNcF2 ZIP14-ADNcR2	AGCCATTATGCCTCTGAGTCGC GTAGCAAGCACTCTGGGAAGCC	296 pb	63°C

Tableau 24 : Séquences des amorces et conditions d'amplifications pour les gènes transporteurs de zinc

Nom des amorces	Séquences des amorces
ZIP5 E1-F1	TT-TCG-GGG-AGA-ATA-GGA-GCC
ZIP5 E1-R1	AG-AGG-ACC-TGG-GAG-ATG-TGG
ZIP5 E2-F1	TA-GCC-CTT-TTG-GTT-GTC-GTC
ZIP5 E2-R1	CT-CCT-GAC-CTC-AGG-TGA-TCC
ZIP5 E3-F1	A-GGG-TTT-CAC-TAT-GTT-GGC
ZIP5 E3-R1	C-GTA-AGG-TGG-AGC-AGA-GAG
ZIP5 E4-F1	C-TCT-CTG-CTC-CAC-CTT-ACG
ZIP5 E4-R1	CC-TAT-ACC-CAA-CAA-CAT-CCC
ZIP5 E5-F1	AT-GTT-GTT-GGG-TAT-AGG-GGC
ZIP5 E5-R1	GA-TTA-CAG-ACA-CGC-ACC-ACC
ZIP5 E6-F1	CA-GGT-GTT-CAT-CTT-CCC-AGC
ZIP5 E6-R1	A-CAG-GAC-AGT-GTT-GGT-GGC
ZIP5 E7-F1	CAG-CCA-CCA-ACA-CTG-TCC
ZIP5 E7-R1	TC-TCC-TCA-GAA-GCA-GGT-TCC
ZIP5 E8-F1	GT-CAG-GAA-GAT-GGG-GAG-AGG
ZIP5 E8-R1	GG-AGA-CAG-AGG-ACA-GGA-TGG
ZIP5 E9-F1	CC-ATC-CTG-TCC-TCT-GTC-TCC
ZIP5 E9-R1	CC-ACC-CAA-ACA-CCT-TAG-TCC
ZIP5 E10-F1	GT-GAG-AGA-TGT-CGG-GTA-GAG
ZIP5 E10-R1	AT-CCT-ATT-GCT-CCT-ACT-GGC

Tableau 25 : Amorces de séquençage du gène *hSLC39A5*

Nom des amorces	Séquence des amorces
ZIP1 E1-F1	ATGATTTTTCCCAACCACTC
ZIP1 E1-R1	AGCCAAGCATTTCATAGCAG
ZIP1 E2-F1	CCCACACTGCTATGAATGC
ZIP1 E2-R1	TGAATCAATCTCCACAAACC
ZIP1 E3-F1	TTGTGTGACTGAGAGTAGCC
ZIP1 E3-R1	GTCTTCCCCAATCCTAATG
ZIP1 E3'-F2	CTGGTGTCTCCCTGGC
ZIP1 E3'-F2	CCACCTGTGCCCTAAGG

Tableau 26 : Amorces de séquençage du gène *hSLC39A1*

Nom des amorces	Séquence des amorces
E1DMT1-F1	CTTCTCCCTCACTTTTCTCC
E1DMT1-R1	AGATGGTGACTTTTGAATGG
E2DMT1-F1	GTCAGGTTGGTCTCTTGTGC
E2DMT1-R1	ACTTGAGCCATCCAGCAG
E3DMT1-F1	GATGGAGGTGAAACTTGGAC
E3DMT1-R1	TACACATAAGAGCCACTGCC
E4DMT1-F1	ATTTGATTCTTGACCTGGGC
E4DMT1-R1	CAGACACACAGATTCTATGGC
E5DMT1-F1	GGACTGTTTATGGTTTAGTGCC
E5DMT1-R1	GGGAAACGGAAGATGTAGAGTC
E6DMT1-F1	TTTCTGCCATTGTCCCTC
E6DMT1-R1	TATCCTGTACCACTTGCCCTC
E7DMT1-F1	GCTGCTCTCTGTCATGTG
E7DMT1-R1	GCTTTTGTGTGATACACC
E8DMT1-F1	TACTATGTTACTCCCGTTTCAC
E8DMT1-R1	CTAACTTGTGTCCCTTGC
E9DMT1-F1	TGTCCCCTAAATCTCTCAGC
E9DMT1-R1	AGGTATTTTCCTTCCCCATC
E10DMT1-F1	CTCTTATTTGGTCCTTGCTTC
E10DMT1-R1	GTCTGGTGTCTGGAACCTCTG
E11DMT1-F1	TGTTTTGGATATTGTCTGAGC
E11DMT1-R1	AGGAGAATCACTTGAACCC
E12DMT1-F1	CATTCTTCTGAGGTCTCTCC
E12DMT1-R1	GATGCCAAGGATTTTCATATAC
E13DMT1-F1	ATACAAGGACCCATAGTAATCC
E13DMT1-R1	CAGTTTCCATTCTCTAAGCC
E14DMT1-F1	CCTCTTCTCCCTGTCTACC
E14DMT1-R1	TCTAACTCCTGGATTCAAGC
E15DMT1-R1	GTAGAAGATGGGCACAGC
E15DMT1-F1	CGGTTGAGTCATAAACACAG
E16DMT1-R1	GCTCCTACCTGTTATTTTGC
E16DMT1-F1	CAGTTTTGAACACCCTTCC

Tableau 27 : Amorces de séquençage du gène *DCT1*

BIBLIOGRAPHIE

1. Danbolt, N., *Acrodermatitis enteropathica*. Br J Dermatol, 1979. **100**(1): p. 37-40.
2. Van Wouwe, J.P., *Clinical and laboratory diagnosis of acrodermatitis enteropathica*. Eur J Pediatr, 1989. **149**(1): p. 2-8.
3. Sehgal, V.N. and S. Jain, *Acrodermatitis enteropathica*. Clin Dermatol, 2000. **18**(6): p. 745-8.
4. Weismann, K., et al., *65Zinc absorption in patients suffering from acrodermatitis enteropathica and in normal adults assessed by whole-body counting technique*. Br J Dermatol, 1979. **101**(5): p. 573-9.
5. Atherton, D.J., et al., *A defect in zinc uptake by jejunal biopsies in acrodermatitis enteropathica*. Clin Sci (Lond), 1979. **56**(5): p. 505-7.
6. Huang, L. and J. Gitschier, *A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 292-7.
7. Kury, S., et al., *Expression pattern, genomic structure and evaluation of the human SLC30A4 gene as a candidate for acrodermatitis enteropathica*. Hum Genet, 2001. **109**(2): p. 178-85.
8. Kury, S., et al., *Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 239-40.
9. Wang, K., et al., *A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(1): p. 66-73.
10. Casilli, F., et al., *Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments*. Hum Mutat, 2002. **20**(3): p. 218-26.
11. McCall, K.A., C. Huang, and C.A. Fierke, *Function and mechanism of zinc metalloenzymes*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1437S-46S.
12. Meacham, S.L., L.J. Johnson, and L.J. Kruskall, *Recommended dietary allowances--then and now: a review*. J Agromedicine, 2002. **8**(2): p. 85-93.
13. Favier, M. and I. Hininger-Favier, *[Zinc and pregnancy]*. Gynecol Obstet Fertil, 2005. **33**(4): p. 253-8.
14. Vallee, B.L. and K.H. Falchuk, *The biochemical basis of zinc physiology*. Physiol Rev, 1993. **73**(1): p. 79-118.
15. Hambidge, K.M., et al., *Plasma and urine zinc in infants and children with extrahepatic biliary atresia*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1987. **6**(6): p. 872-7.

16. Lee, H.H., et al., *Zinc absorption in human small intestine*. Am J Physiol, 1989. **256**(1 Pt 1): p. G87-91.
17. Sandstrom, B., et al., *Retention of zinc and calcium from the human colon*. Am J Clin Nutr, 1986. **44**(4): p. 501-4.
18. Coyle, P., et al., *Metallothionein: the multipurpose protein*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(4): p. 627-47.
19. Turnlund, J.R., et al., *A stable isotope study of zinc absorption in young men: effects of phytate and alpha-cellulose*. Am J Clin Nutr, 1984. **40**(5): p. 1071-7.
20. Sandstrom, B., *Bioavailability of zinc*. Eur J Clin Nutr, 1997. **51 Suppl 1**: p. S17-9.
21. Sandstrom, B., A. Cederblad, and B. Lonnerdal, *Zinc absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas*. Am J Dis Child, 1983. **137**(8): p. 726-9.
22. Berg, J.M. and Y. Shi, *The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1081-5.
23. Maret, W., *The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1455S-8S.
24. Vallee, B.L., J.E. Coleman, and D.S. Auld, *Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(3): p. 999-1003.
25. Frederickson, C.J., J.Y. Koh, and A.I. Bush, *The neurobiology of zinc in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 449-62.
26. Cuajungco, M.P. and G.J. Lees, *Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders*. Neurobiol Dis, 1997. **4**(3-4): p. 137-69.
27. Takeda, A., *Movement of zinc and its functional significance in the brain*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **34**(3): p. 137-48.
28. Huang, X., et al., *Alzheimer's disease, beta-amyloid protein and zinc*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1488S-92S.
29. Cuajungco, M.P. and G.J. Lees, *Zinc and Alzheimer's disease: is there a direct link?* Brain Res Brain Res Rev, 1997. **23**(3): p. 219-36.
30. Palmiter, R.D. and L. Huang, *Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 744-51.
31. Grahn, B.H., et al., *Zinc and the eye*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(2 Suppl): p. 106-18.
32. Eggert-Kruse, W., et al., *Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality?* Fertil Steril, 2002. **77**(2): p. 260-9.

33. Wong, W.Y., et al., *The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men*. Reprod Toxicol, 2001. **15**(2): p. 131-6.
34. MacDonald, R.S., *The role of zinc in growth and cell proliferation*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1500S-8S.
35. Cunningham, B.C., M.G. Mulkerrin, and J.A. Wells, *Dimerization of human growth hormone by zinc*. Science, 1991. **253**(5019): p. 545-8.
36. Salgueiro, M.J., et al., *The role of zinc in the growth and development of children*. Nutrition, 2002. **18**(6): p. 510-9.
37. Meier, C.A., *Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors*. J Recept Signal Transduct Res, 1997. **17**(1-3): p. 319-35.
38. Ortega, R.M., et al., *Influence of calcium intake on gestational hypertension*. Ann Nutr Metab, 1999. **43**(1): p. 37-46.
39. Rajagopalan, S., et al., *The Ig-related killer cell inhibitory receptor binds zinc and requires zinc for recognition of HLA-C on target cells*. J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4143-6.
40. Rink, L. and H. Kirchner, *Zinc-altered immune function and cytokine production*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1407S-11S.
41. Fraker, P.J., et al., *The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1399S-406S.
42. Baum, M.K., et al., *Zinc status in human immunodeficiency virus type 1 infection and illicit drug use*. Clin Infect Dis, 2003. **37 Suppl 2**: p. S117-23.
43. Ibs, K.H. and L. Rink, *Zinc-altered immune function*. J Nutr, 2003. **133**(5 Suppl 1): p. 1452S-6S.
44. Lee, S.P., et al., *Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro*. Biochemistry, 1997. **36**(1): p. 173-80.
45. Mocchegiani, E., et al., *Benefit of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine (AZT) therapy against opportunistic infections in AIDS*. Int J Immunopharmacol, 1995. **17**(9): p. 719-27.
46. Powell, S.R., *The antioxidant properties of zinc*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1447S-54S.
47. Gruenheid, S., et al., *Identification and characterization of a second mouse Nramp gene*. Genomics, 1995. **25**(2): p. 514-25.
48. Curie, C., et al., *Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport*. Biochem J, 2000. **347 Pt 3**: p. 749-55.

49. McMahon, R.J. and R.J. Cousins, *Mammalian zinc transporters*. J Nutr, 1998. **128**(4): p. 667-70.
50. Reeves, P.G., M. Briske-Anderson, and L. Johnson, *Pre-treatment of Caco-2 cells with zinc during the differentiation phase alters the kinetics of zinc uptake and transport*(2). J Nutr Biochem, 2001. **12**(12): p. 674-684.
51. Liuzzi, J.P. and R.J. Cousins, *Mammalian zinc transporters*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 151-72.
52. Gaither, L.A. and D.J. Eide, *Eukaryotic zinc transporters and their regulation*. Biometals, 2001. **14**(3-4): p. 251-70.
53. Michalczyk, A.A., et al., *Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells*. Biochem J, 2002. **364**(Pt 1): p. 105-13.
54. Kambe, T., et al., *Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19049-55.
55. Inoue, K., et al., *Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, Znt5*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(15): p. 1775-84.
56. Kirschke, C.P. and L. Huang, *ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus*. J Biol Chem, 2003. **278**(6): p. 4096-102.
57. Huang, L., C.P. Kirschke, and J. Gitschier, *Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26389-95.
58. Colvin, R.A., et al., *Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons*. J Nutr, 2000. **130**(5S Suppl): p. 1484S-7S.
59. Sekler, I., et al., *Distribution of the zinc transporter ZnT-1 in comparison with chelatable zinc in the mouse brain*. J Comp Neurol, 2002. **447**(3): p. 201-9.
60. Kim, A.H., et al., *L-type Ca(2+) channel-mediated Zn(2+) toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells*. Brain Res, 2000. **886**(1-2): p. 99-107.
61. Sim, D.L. and V.T. Chow, *The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif*. Genomics, 1999. **59**(2): p. 224-33.
62. Sim del, L.C., W.M. Yeo, and V.T. Chow, *The novel human HUEL (C4orf1) protein shares homology with the DNA-binding domain of the XPA DNA repair protein and displays nuclear translocation in a cell cycle-dependent manner*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(5): p. 487-504.

63. Palmiter, R.D. and S.D. Findley, *Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc*. *Embo J*, 1995. **14**(4): p. 639-49.
64. Palmiter, R.D., T.B. Cole, and S.D. Findley, *ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration*. *Embo J*, 1996. **15**(8): p. 1784-91.
65. Palmiter, R.D., et al., *ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14934-9.
66. Cragg, R.A., et al., *A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22789-97.
67. Chimienti, F., et al., *Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules*. *Diabetes*, 2004. **53**(9): p. 2330-7.
68. Eide, D.J., *The SLC39 family of metal ion transporters*. *Pflugers Arch*, 2004. **447**(5): p. 796-800.
69. Gaither, L.A. and D.J. Eide, *The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22258-64.
70. Wang, F., et al., *The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(49): p. 51433-41.
71. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 448-64.
72. Taylor, K.M., et al., *Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(2): p. 427-32.
73. Taylor, K.M., et al., *Structure-function analysis of HKE4, a member of the new LIV-1 subfamily of zinc transporters*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 1): p. 131-9.
74. Lioumi, M., et al., *Isolation and characterization of human and mouse ZIRT1, a member of the IRT1 family of transporters, mapping within the epidermal differentiation complex*. *Genomics*, 1999. **62**(2): p. 272-80.
75. Gaither, L.A. and D.J. Eide, *Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(8): p. 5560-4.
76. Taylor, K.M., et al., *Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 1): p. 51-9.
77. Begum, N.A., et al., *Mycobacterium bovis BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new*

- protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. Genomics*, 2002. **80**(6): p. 630-45.
78. Ghisolfi, J., [*Taurine in human nutrition*]. *Arch Fr Pediatr*, 1987. **44**(7): p. 550-1.
79. Kury, S., et al., *Mutation spectrum of human SLC39A4 in a panel of patients with acrodermatitis enteropathica*. *Hum Mutat*, 2003. **22**(4): p. 337-8.
80. Nakano, A., et al., *Novel SLC39A4 mutations in acrodermatitis enteropathica*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(6): p. 963-6.
81. Krawczak, M. and D.N. Cooper, *The human gene mutation database*. *Trends Genet*, 1997. **13**(3): p. 121-2.
82. Dufner-Beattie, J., et al., *The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 49082-90.

Titre de Thèse : Recherche de nouvelles bases moléculaires responsables de l'acrodermatite entéropathique

RESUME

L'acrodermatite entéropathique (AE) est un syndrome héréditaire rare, transmis de manière autosomique récessive, dont la cause est une malabsorption intestinale du zinc. En 2002, des anomalies moléculaires observées dans le gène transporteur de zinc *hSLC39A4* ont permis d'associer ce gène à cette pathologie. Malgré tout, pour certains patients présentant un authentique syndrome clinique d'AE, nous ne retrouvons pas de mutations homozygotes ou hétérozygotes composites après séquençage du gène *hSLC39A4*. Nous nous sommes fixé comme objectif de mettre en évidence un autre mécanisme moléculaire pouvant expliquer leurs pathologies. Nous avons donc mis au point une technique de PCR semi-quantitative (QMPSF) permettant la mise en évidence d'éventuels grands réarrangements du gène *hSLC39A4*. En parallèle, nous avons examiné plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la pathogénie du syndrome, par le biais d'analyses mutationnelles réalisées chez les patients sélectionnés.

MOTS-CLES

Acrodermatite entéropathique
Transporteur de zinc
Famille de gènes *hSLC30A*
Famille de gènes *hSLC39A*
Analyse mutationnelle
Gène *hSLC39A4*
QM-PSF