

Génétique humaine

Mr. Jean-Louis MANDEL, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

Enseignement

Une série de 6 cours a été donnée les 11, 18 et 25 mars 2009 au Collège de France, sur le thème : « Maladies affectant les fonctions cognitives : progrès récents dans les approches génétiques ». Les 2 premiers cours ont porté sur le retard mental lié au chromosome X, et sur le syndrome de retard mental avec X fragile, thèmes déjà abordés en 2003, et revisités à la lumière d'importants travaux récents. L'historique de ce domaine a été brièvement rappelé, depuis les observations épidémiologiques d'un excès de mâles avec retard mental (ratio hommes/femmes d'environ 1,3), attribuées au départ à un biais social, les premières observations dans les années 1940-1960 de grandes familles avec transmission liée au chromosome X de retard mental, souvent accompagné de manifestations cliniques définissant un syndrome, et la reconnaissance de l'importance de ce mode de transmission à partir de la thèse de Lehrke publiée en 1974, et de l'identification du syndrome X fragile en 1976-77. L'ère de la génétique moléculaire permet l'identification du gène FMR1 muté dans le syndrome X fragile en 1991, de gènes associés à des formes syndromiques (gène Rsk2 et syndrome de Coffin-Lowry, gène ATRX etc.), mais l'extrême hétérogénéité des formes non clairement syndromiques rend difficile au départ les stratégies de « clonage positionnel » et nécessitent la mise en œuvre de collaborations internationales, et notamment du consortium européen XLMR qui aboutit en 5 ans (1998-2003) à l'identification d'une quinzaine de gènes, mais qui ne rendent compte que de 25 à 30 % des familles avec mode de transmission clairement lié au chromosome X. Certains laboratoires (H. Ropers à Berlin) mettent en œuvre à partir de 2005 des approches de séquençage de plus en plus systématique des gènes du chromosome X dans ces familles, culminant avec le séquençage de 720 gènes du chromosome X dans 200 à 250 familles, par le Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge), qui s'était déjà illustré comme un contributeur majeur du séquençage du génome humain. Ces travaux ont permis

d'atteindre le nombre de 80 gènes identifiés, tant pour les formes syndromiques que pour celles qualifiées de non-syndromiques, et la reconnaissance d'une frontière floue entre ces deux catégories: certaines mutations de gènes « syndromiques » étant retrouvées dans des familles sans caractéristiques cliniques évidentes en dehors du retard mental, et à l'inverse, des études cliniques affinées sur des familles présentées initialement comme « non-syndromiques » avec mutation dans un gène défini permettent de définir des caractéristiques cliniques communes (par ex : hypoplasie cérébelleuse associée aux mutations du gène OPHN1, mouvements dystoniques des mains et mutations du gène ARX). Les gènes identifiés appartiennent à des catégories fonctionnelles très diverses : régulateurs transcriptionnels, voie de signalisation des GTPases Rho/Rac, protéines d'adhésion et protéines ayant une fonction à la synapse, transporteurs (de créatine ou d'hormone thyroïdienne), métabolisme des ARNs etc. Quelques exemples ont été présentés : le gène MCT8 correspondant à un syndrome de retard mental sévère avec hypotonie et faiblesse musculaire, décrit en 1944 dans une grande famille, et qui code pour un transporteur membranaire de l'hormone thyroïdienne T3. Un autre exemple frappant est l'identification d'une mutation faux-sens très précise d'un facteur transcriptionnel (sous-unité MED12 du Mediator) retrouvée de manière récurrente chez 15 % des patients avec un syndrome complexe dit FG (RM, hypotonie, constipation ou anomalies anales, fente labiale ou palatine). Des mutations différentes du régulateur transcriptionnel à homéodomaine ARX peuvent donner des syndromes très différents (d'une lissencéphalie avec anomalies génitales à un syndrome de RM avec spasmes infantiles, jusqu'à des formes de retard mental modéré avec symptomatologie neurologique discrète). Une découverte particulièrement intrigante (Dibbens *et al.* 2008) quant aux mécanismes sous-jacents est l'identification de mutations d'une protocadhérine dans une forme d'épilepsie avec RM limitée aux filles, alors que les garçons porteurs de la même mutation dans ces familles ne sont pas atteints (dans tous les autres cas de mutations liées au X, les garçons sont toujours beaucoup plus sévèrement atteints que les filles). Une part importante du cours a été consacrée à une analyse détaillée de l'article de Tarpey *et al.*, qui venait d'être accepté pour publication dans Nature Genetics, rapportant les résultats du séquençage systématique de gènes du chromosome X, car il illustre la puissance d'une telle approche, mais aussi la difficulté d'interprétation d'une masse de données de variations génomiques très rares dont la pathogénicité est incertaine. Ce travail, qui a permis d'identifier de manière certaine 9 gènes de RM lié au X, a aussi permis de conclure que des mutations perte de fonction complète étaient compatibles avec une vie (apparemment) normale, pour 1 % des gènes du chromosome X. Plus de 1 800 variations de séquence codante ont été observées, dont 980 entraînant un changement d'acide aminé, et 50 % des ces variations sont non récurrentes (observées dans un seul individu), rendant l'analyse de leur pathogénicité éventuelle très difficile. Toutefois, des faux sens affectant une protéine post-synaptique (CASK) entraînent chez les garçons un RM en général associé à un nystagmus, alors que des mutations troncantes sont responsables de malformations cérébrales

sévères chez les filles, et entraînent une létalité néonatale chez les garçons. Malgré cet effort gigantesque, une mutation causale n'a pas été identifiée dans une majorité des familles analysées : certaines d'entre elles pourraient relever d'agrégation de cas non monogéniques, ou être liées à des mutations autosomiques. Nous avons antérieurement montré que des mutations de gènes du chromosome X à forte pénétrance ne peuvent rendre compte au maximum que de 10 % des cas de RM chez les garçons (Mandel et Chelly 2004), et ne peuvent donc expliquer à elles seules l'excès masculin de RM, laissant une place à des hypothèses d'hérédité multifactorielle avec des allèles à faible pénétrance sur le chromosome X, ou à une sensibilité particulière au cours du développement fœtal du cerveau masculin (de Courten-Myers 1999, Craig *et al.* 2004), et il faut rappeler que d'autres pathologies telles que l'autisme, la dyslexie ou la maladie de Hirschprung montrent un biais inexplicable d'excès masculin beaucoup plus fort que pour le retard mental.

Le 2^e cours a été consacré au syndrome X fragile, la cause monogénique la plus fréquente de retard mental et premier exemple d'une pathologie due à des mutations par expansion instable de répétition trinuécléotidique, et notamment aux développements récents dans ce domaine. La découverte par Paul et Randy Hagerman *et coll.*, en 2002 d'une pathologie neurodégénérative tardive et de pénétrance partielle (mais forte chez les mâles, cf. Jacquemont *et al.* 2004) associée à la présence d'une expansion CGG modérée (prémuation) a été une surprise totale. Ce syndrome parkinsonien FXTAS (*fragile X associated tremor ataxia syndrome*) est un nouvel exemple de mécanisme pathologique d'ARN messenger toxique (comme pour la myotonie dystrophie). En effet l'expansion liée à la prémuation est présente dans l'ARNm FMR1 (alors que la mutation complète, expansion plus grande, entraîne une inactivation transcriptionnelle de l'expression du gène FMR1), et ce mécanisme a pu être modélisé dans la drosophile et la souris.

Après un rappel des propriétés de la protéine FMRP et des fonctions proposées comme régulateur du transport et de la traduction post-synaptique de certains ARNm, l'essentiel du cours a été consacré aux apports des modèles FMR1 KO dans la souris ou la drosophile pour l'analyse des mécanismes pathogéniques liés à l'absence de la protéine FMRP, et à la validation de l'hypothèse d'une suractivation de la signalisation par les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR5 et mGluR1), entraînant secondairement une diminution des récepteurs AMPA, associés à des altérations électrophysiologiques de la plasticité synaptique (Long Term Depression augmentée, et Long Term Potentiation diminuée) (Huber et Bear, 2002). Les premiers éléments en faveur de cette hypothèse étaient surtout pharmacologiques (utilisation du MPEP, inhibiteur de mGluR5) dans les modèles souris et drosophile (Yan *et al.* 2005, McBride *et al.* 2005). Très récemment, les élégants travaux de Mark Bear ont montré par des approches génétiques que l'inhibition partielle de l'activité mGluR5 améliorerait le phénotype des souris FMR1 KO (Dolen *et al.* 2007). Le modèle drosophile (inactivation de l'homologue dFXR correspondant à l'ancêtre commun des 3 gènes de la famille FMR1/FXR1/FXR2 chez les vertébrés) a été aussi utilisé de manière très élégante par le groupe de

S. Warren, pour un criblage de molécules à effet potentiellement thérapeutique, se basant sur la létalité induite par le glutamate chez les drosophiles mutantes (Chan *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2008), et identifiant la voie Gabaergique comme également d'intérêt thérapeutique potentiel.

Le 3^e cours a été consacré au syndrome de Rett, décrit en 1966, qui fut longtemps une des énigmes en génétique humaine, un très sévère syndrome autistique presque toujours sporadique et affectant seulement les filles (c'est l'une des causes les plus fréquentes de retard mental sévère chez les filles, avec une incidence de 1/10 000). Le gène fut identifié en 1999, et code pour une protéine importante impliquée dans les régulations épigénétiques et liant l'ADN méthylé, MECP2. Les mutations (de type perte de fonction) de ce gène sont en général des néomutations d'origine paternelle, expliquant en partie la fréquence et la spécificité d'atteinte des filles, et ces mêmes mutations sont responsables d'encéphalopathies néonatales rapidement létales chez les garçons (donc une présentation clinique différente). 95 % des cas de filles avec forme « classique » présentent une mutation du gène MECP2, mais seulement 50 % des formes variantes. Des formes variantes avec spasmes infantiles ou épilepsie réfractaire au traitement ont été trouvées dues à des mutations d'un autre gène du chromosome X, CDKL5 (une kinase cycline-dépendante) (cf. les corrélations génotypes phénotypes établies par Bahi-Buisson *et al.* 2008). D'autre part il a été montré en 2005 que des duplications de la région du gène MECP2 étaient responsables de formes de retard mental sévère chez les garçons (Van Esch *et al.* 2005), indiquant que la régulation précise de l'activité MECP2 est critique pour un fonctionnement normal du cerveau. De nombreux travaux ont été consacrés ces 10 dernières années à l'étude des fonctions de MECP2 et à la construction et caractérisation de modèles souris du syndrome de Rett (travaux de A. Bird, R. Jaenisch et H. Zoghbi), permettant d'analyser les processus neuropathologiques, et aussi les effets épigénétiques et sur la régulation transcriptionnelle de l'inactivation de MECP2. Les travaux de A. Bird avaient montré que MECP2, en se fixant à des régions régulatrices d'ADN méthylé, recrutait des complexes de répression de la transcription dépendants ou non de l'acétylation des histones (cf. Bienvenu *et al.* 2006). Un des points importants est d'identifier les gènes cibles physiologiquement importants de MECP2. L'équipe de Jaenisch a ainsi rapporté que le gène du BDNF (brain derived neurotrophic factor) est une cible de MECP2, et que l'inactivation génétique de BDNF augmente la pathologie des modèles Rett de souris, et qu'une surexpression de BDNF au contraire corrige des déficits locomoteurs et des anomalies électrophysiologiques des souris Rett, et en augmente la durée de vie (Chang *et al.* 2006). Si les approches transcriptomiques sur des cellules de patients ou le cerveau de modèles souris n'avaient pas au départ permis d'identifier des cibles de manière convaincante, des travaux récents de l'équipe de H. Zoghbi ciblant l'hypothalamus de souris sous-exprimant ou sur-exprimant MECP2 a montré que MECP2 contrôle l'expression de milliers de gènes, mais de manière inattendue, semble contrôler positivement la majorité d'entre eux, notamment par association avec le régulateur CREB1

(Chahrour *et al.* 2008). MECP2 serait donc, selon les gènes, un activateur ou un répresseur de transcription. Alors que les travaux de Jaenisch (sur des mutants MECP2 KO conditionnels) suggéraient que la pathologie était uniquement liée à l'absence de MECP2 dans les neurones, un travail récent suggère que l'expression de MECP2 dans les cellules gliales (astrocytes) serait nécessaire pour le maintien d'une arborisation dendritique des neurones, impliquant la sécrétion par les astrocytes mutants de facteurs interférant avec la fonction neuronale (Ballas *et al.* 2009). Les patients avec syndrome de Rett présentent des anomalies du rythme respiratoire modélisées chez les souris déficientes en MECP2. L'équipe de Villard a montré dans ces souris des déficits noradrénergiques, qui peuvent être corrigés par un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline, la désipramine, avec des effets cliniques sur la respiration et la survie des souris (Roux *et al.* 2007). Des essais cliniques sont en cours chez des patients. La recherche de stratégie thérapeutique est poursuivie de manière active sur les modèles précliniques de souris : des effets favorables ont été ainsi montré par l'administration de peptide actif dérivé du facteur de croissance IGF1 (Tropea *et al.* 2009), ou d'une ampakine (molécule stimulant les récepteurs AMPA) et entraînant une augmentation du BDNF (Ogier *et al.* 2007), et les inhibiteurs d'histone déacetylases représentent également une voie intéressante de correction des anomalies épigénétiques (Kazantsev *et al.* 2008). Tous ces travaux laissent espérer à moyen terme des progrès thérapeutiques dans cette très sévère pathologie.

Les 4^e et 5^e cours ont porté sur des pathologies multifactorielles et particulièrement complexes, l'autisme et la schizophrénie, pour lesquels les approches génétiques pour identifier des gènes de prédisposition avaient été longtemps infructueuses ou génératrices de résultats contradictoires. Les analyses génomiques à haut débit et portant sur des cohortes importantes de patients semblent apporter des éclairages plus convaincants, et notamment par l'implication, pour ces deux pathologies, de réarrangements génomiques de type CNV (*copy number variants*), pouvant survenir, en tout cas pour l'autisme, de manière *de novo*. Mais la grande diversité de ces réarrangements, qui ne concernent qu'une minorité de patients, rend encore les interprétations difficiles. En ce qui concerne l'autisme (il faudrait plutôt dire les syndromes autistiques, tant cette pathologie apparaît diverse et hétérogène), la grande concordance entre jumeaux monozygotes, et la concordance relativement faible des jumeaux dizygotes ou dans les fratries, est compatible avec un effet majeur d'événements de néomutation. Parmi les travaux importants dans ce domaine, on peut citer l'identification de mutations affectant des protéines post-synaptiques, les neurologines (équipe de T. Bourgeron) chez de très rares patients avec ou sans retard mental associé. Des mutations affectant Shank3, protéine partenaire des neurologines, sont également responsables (rarement) de troubles autistiques (le gène Shank3 étant dans la région délétée dans le très sévère syndrome de délétion 22q13) (Durand *et al.* 2007). Ces travaux avaient été réalisés par des approches « gènes candidats ». Les approches génome entier (CGH array) identifient des CNV rares (non présentes chez des contrôles) ou présentes comme événements

de néomutation chez 10-12 % des patients, et les régions génomiques concernées sont enrichies en gènes importants pour la fonction et la plasticité des synapses, telles que les protéines des densités postsynaptiques Shank3, neuroligines, neurexine (Sebat *et al.* 2007, Marshall *et al.* 2008, Christian *et al.* 2008). Des approches de type cartographie par homozygotie dans des cas d'autisme dans des familles consanguines ont mis en évidence des délétions homozygotes dans 5 des 78 familles analysées, affectant également de bons gènes candidats (protocadherine, canaux ioniques...), et suggérant que des formes récessives d'autisme ne seraient pas exceptionnelles (la stratégie utilisée ne permettant pas la détection de mutations ponctuelles) (Morrow *et al.* 2008). Des travaux de l'équipe de Bourgeron suggèrent également des cas liés à une synthèse anormale de mélatonine, par des analyses biochimiques et génétiques (gène ASMT), mais ces travaux restent à confirmer (Melke *et al.* 2008, Toma *et al.* 2007).

La schizophrénie est une pathologie fréquente (touchant 1 % de la population), avec des études de jumeaux ou d'adoption suggérant un rôle important des prédispositions génétiques. La haute fréquence de troubles psychotiques dans le syndrome de délétion 22q11 est connue depuis plus de 10 ans, suggérant l'implication de gènes présents dans la région délétée (COMT, PRODH). Un travail très récent de l'équipe de D. Campion et T. Frébourg (Rouen) a été commenté dans le cours, car il montre, par l'analyse du nombre de copies de 28 gènes précédemment impliqués dans des événements de type CNV, que la fréquence des CNV à ces *loci* est similaire dans des cohortes de patients autistes, schizophrènes ou avec retard mental (de 4 à 6 %, contre 0,4 % chez les contrôles) suggérant un continuum étiologique et physiopathologique entre ces 3 types de pathologie (Guilmatre *et al.* 2009). En particulier, une délétion récurrente de 350 kb affectant le gène PRODH (localisé dans la région du syndrome del 22q11) a été identifiée chez 14 patients avec l'une ou l'autre de ces pathologies. Cette délétion apparaît dans la plupart des cas héritée d'un parent normal, et Guilmatre *et al.* mettent également en causes des variants hypofonctionnels du gène PRODH sur le chromosome non délété. Un autre gène particulièrement étudié dans le contexte de la schizophrénie est le gène DISC1 (*disrupted in schizophrenia*), identifié initialement au point de cassure d'une translocation chromosomique coségrégeant avec une schizophrénie dans une grande famille (Millar *et al.* 2000). En 2007-2008, 114 articles référencés dans Pubmed concernent ce gène, avec des études de modèles d'inactivation chez la souris (Hikida *et al.* 2007, Shen *et al.* 2008), et des études d'association à des traits psychologiques (anhédonie sociale, Tomppo *et al.* 2009), l'association de DISC1 avec une protéine centrosomale (PCM1), autre gène candidat pour la schizophrénie (Datta *et al.* 2008, Kamiya *et al.* 2008). Des études de liaison dans des familles, et d'association dans des cohortes de patients avaient également mis en évidence un rôle du gène neuréguline, confirmé dans diverses populations, mais d'effet limité (risque relatif de 1,8 à 2,2 % pour les porteurs de l'allèle à risque). La neuréguline est une protéine sécrétée par les neurones et qui joue un rôle important dans le développement neural et la plasticité synaptique

(Mei *et al.* 2008). Enfin, en 2008, toute une série d'études ont montré l'implication de CNV rares dans la schizophrénie, comme facteurs de prédisposition (avec des Odds ratios d'environ 10 à 15 pour des CNV récurrentes en 1q21.1 et 15q13.3, étude islandaise portant initialement sur 1400 cas et 33 000 contrôles, et répliquée dans des cohortes totalisant 3300 cas et 8000 contrôles!) (Stefansson *et al.* 2008, Walsh *et al.* 2008) rapportant la présence de CNV rares affectant préférentiellement des gènes impliqués dans le développement et les fonctions neurales (cf. aussi McDonovan *et al.* 2008, The international schizophrenia consortium 2008). Toutefois la très grande diversité des anomalies génomiques observées à chaque fois dans un très petit nombre de patients rendra difficile l'évaluation individuelle de leur contribution à la pathologie présentée par les patients.

Le dernier cours a été consacré à la maladie d'Alzheimer, l'un des principaux problèmes actuels en santé publique, et caractérisée au plan de l'anatomopathologie par la présence de plaques amyloïdes extracellulaires (contenant le peptide β amyloïde A β) et de structures anormales intraneuronales (dégénérescence neurofibrillaire, contenant la protéine tau hyperphosphorylée), générant des controverses sur le rôle pathogénique initial (β amyloïde ou tau). Les études de jumeaux suggéraient une part génétique importante, ainsi que l'observation que les patients avec trisomie 21 développaient avec une grande fréquence une maladie d'Alzheimer (MA) avec plaques amyloïdes, plus précoce que celle observée dans la population générale. Les premiers grands succès des approches génétiques ont été l'identification dans des formes précoces à hérédité dominante de MA (formes très rares), de mutations faux-sens soit dans le gène du précurseur APP du peptide β amyloïde, soit dans les gènes appelés présénilin 1 et 2, codant pour des protéines membranaires impliquées dans la production (par protéolyse) du peptide β amyloïde. Ceci confortait le rôle primordial dans le processus pathologique du peptide amyloïde, et a suscité de nombreux travaux, dont des travaux visant à inhiber pharmacologiquement la production de ce peptide. Une autre étape capitale a été l'identification en 1993 par A. Roses d'un variant polymorphique du gène de l'apolipoprotéine E (un transporteur de cholestérol) comme facteur de risque majeur de MA dans la population générale. La présence d'un ou 2 allèles E4 augmente le risque de MA de 3 fois à 6-10 fois, alors que l'allèle E2 est protecteur (l'allèle E3 le plus fréquent dans la population représentant le niveau de base). L'intérêt de cette découverte est manifesté par le fait que depuis 1996, environ 200 articles scientifiques sont publiés chaque année concernant PoE et MA, sans que le mécanisme pathogénique soit clairement élucidé. L'hypothèse la mieux documentée, notamment par l'étude de modèles souris de MA, propose un rôle de ApoE (secrétée dans le cerveau par les astrocytes) dans la régulation du niveau du peptide A β , de sa déposition dans les plaques et de son élimination. ApoE peut se lier au peptide A β . Un article récent a été présenté (Jiang *et al.* 2008), qui montre que ApoE est impliqué dans la dégradation protéolytique de A β , de manière dépendant de l'état de lipitation d'ApoE et de la nature de l'isoforme (ApoE2, 3 ou 4). Le traitement d'un modèle souris de MA par une

molécule agoniste du récepteur nucléaire LXR, qui favorise la lipodation d'ApoE, fait diminuer le niveau d'A β et améliore certains tests de mémoire de ces souris. Ceci suggère donc une nouvelle voie potentielle de traitement de la MA. D'autres travaux suggéraient un autre récepteur nucléaire, PPAR γ comme cible thérapeutique potentielle agissant sur la sensibilité à l'insuline, le métabolisme énergétique et lipidique, ainsi que sur des phénomènes inflammatoires pouvant jouer un rôle dans la MA. Un intéressant article par Risner *et al.* (2006) qui rapporte les résultats d'une étude clinique de traitement par un agoniste de PPAR γ , la rosiglitazone, suggère qu'un effet favorable était obtenu chez les patients non porteurs d'un allèle ApoE4, alors qu'aucun effet n'était noté chez les porteurs d'ApoE4. Ce résultat, s'il est confirmé par d'autres études, illustre l'utilité de caractériser les prédispositions génétiques au cours d'essais cliniques. Le gène ApoE, bien que très important, n'explique pas tous les aspects de prédisposition génétique à la MA. De très nombreux travaux (études de liaison, études d'association à des gènes candidats) ont généré une littérature abondante mais peu convaincante. L'ère des approches à haut débit de *Genome wide association study* (GWAS) doit permettre de résoudre ce problème, au moins en partie. La première étude publiée indiquait qu'il n'existait pas d'autre gène avec un effet aussi important qu'ApoE (Coon *et al.* 2007). Plusieurs autres *loci* ont été proposés (gène GAB2, Reiman *et al.* 2007, gène PCDH11X de protocadhérine sur le chromosome X, Carrasquillo *et al.* 2009, gène en 14q31, Bertram *et al.* 2008), toutefois toutes ces données très récentes demandent à être validées par des études de réplication, et interprétées en terme de signification physiopathologique. Il faut rappeler, en ce qui concerne le diagnostic prédictif, qu'en dehors des formes précoces monogéniques de MA, il n'existe pas à l'heure actuelle de justification à des tests présymptomatiques basés sur les variants du gène ApoE.

En dehors de ces cours au Collège de France, j'ai donné un cours de 1 h 30 à l'université Claude Bernard à Lyon (retard mental lié au chromosome X, physiopathologie du syndrome X fragile, 12 décembre 2008), ainsi qu'un cours (4 h) de génétique humaine multifactorielle dans le cadre d'un master à l'université de Strasbourg (31 octobre 2008).

Recherche

Le groupe de recherche en génétique humaine fait partie du département de neurobiologie et génétique de l'IGBMC (Institut de génétique et biologie moléculaire et cellulaire, UMR 7104 du CNRS, Inserm U964 et université de Strasbourg). Il se consacre à l'étude des mécanismes génétiques et physiopathologiques de maladies monogéniques neurologiques ou musculaires. Des aspects de recherche clinique sont également développés dans le laboratoire hospitalier de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg, dirigé par J.-L. Mandel. Jean-Louis Mandel est directeur, depuis juin 2008, de l'Institut clinique de la souris (ICS), une importante plateforme technologique associée à l'IGBMC et impliquée dans la création et le phénotypage de souris génétiquement modifiées.

Jean-Louis Mandel est plus particulièrement impliqué dans les thématiques suivantes :

- 1) Syndrome de retard mental avec chromosome X fragile et fonction de la protéine FMRP (avec Hervé Moine, CR1 CNRS).
- 2) Myopathies myotubulaire et centronucléaires et analyse fonctionnelle d'une famille de phosphoinositides phosphatases: les myotubularines (équipe dirigée par Jocelyn Laporte, DR2 Inserm).
- 3) Études génétiques du syndrome de Bardet-Biedl, en collaboration avec le Pr. Hélène Dollfus (Equipe AVENIR/Inserm; Faculté de Médecine de Strasbourg).

Yvon Trottier (DR2 INSERM) dirige depuis 2006 l'équipe qui se consacre aux mécanismes pathogéniques des maladies neurodégénératives causées par des expansions de polyglutamine, dont la maladie de Huntington et l'ataxie spinocérébelleuse de type 7.

Hélène Puccio (DR2 Inserm, lauréate d'un « ERC starting grant » du Conseil Européen de la Recherche) et son équipe s'intéressent aux mécanismes physiopathologiques de l'ataxie de Friedreich et d'autres ataxies récessives liées à des déficits mitochondriaux.

L'équipe dirigée par Michel Koenig (PU-PH) se consacre à l'identification de gènes impliqués dans des formes d'ataxies récessives, et aux études de corrélation génotype/phénotype pour cette pathologie très hétérogène.

L'équipe d'André Hanauer (MCU) étudie les mécanismes du syndrome de Coffin-Lowry (retard mental syndromique lié au chromosome X, impliquant la protéine kinase Rsk2).

Stanislas du Manoir (CR1 Inserm) et son équipe développent des stratégies d'étude des réarrangements chromosomiques (amplifications, délétions) présents dans des tumeurs solides, dans le but notamment d'identifier des oncogènes impliqués dans la progression tumorale ou des marqueurs génomiques associés au pronostic vital.

1) Syndrome de retard mental avec chromosome X fragile et fonction de la protéine FMRP (thème codirigé par H. Moine et J.-L. Mandel)

Le syndrome X-fragile représente la forme la plus fréquente de retard mental monogénique. Ce syndrome résulte d'une expansion instable de répétitions CGG dans le gène *FMRI*, entraînant sa répression transcriptionnelle. *FMRI* code pour la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) qui lie des ARN messagers au sein de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes et joue un rôle de régulation de la traduction et/ou du transport de ces ARNm. Afin de caractériser la fonction et les mécanismes d'action de cette protéine, nous avons entrepris d'identifier et caractériser des ARNm se liant à FMRP et pouvant constituer des

cibles de son action. Nous avons montré antérieurement que FMRP se lie de manière spécifique et avec une forte affinité aux ARNm contenant un motif structural de type « G(uanine)-quartet » (Schaeffer *et al.* 2001). Nous avons retrouvé ce motif dans l'ARNm de la phosphatase *PP2A* et suggéré un rôle de FMRP dans le contrôle traductionnel de cette importante protéine régulatrice (Castets *et al.* 2005). Nous avons montré que l'interaction de FMRP avec son propre ARNm, au niveau d'un G-quartet présent dans la région codante (exon 15), peut moduler l'épissage alternatif du gène *FMRI*. En effet, ce G-quartet présente des propriétés activatrices de l'épissage et la liaison de FMRP avec ce motif pourrait constituer une boucle d'autorégulation (Didiot *et al.* 2008).

L'impact majeur de l'absence de la protéine FMRP se situant au niveau des fonctions cérébrales nous avons entrepris de rechercher les ARNm neuronaux liés par FMRP contenant le motif G-quartet. Nous avons récemment montré expérimentalement la présence de motifs G-quartet et leur liaison par FMRP au niveau de la région 3' non traduite de deux gènes importants pour la plasticité synaptique et précédemment proposés comme cible de FMRP. Nous avons montré que le motif G-quartet sur ces ARNm neuronaux est nécessaire et suffisant pour leur adressage au niveau des dendrites. Le motif ARN G-quartet représenterait donc un signal d'adressage vers les dendrites (Subramanian *et al.*, en préparation). La liaison de FMRP à ce motif étant susceptible d'altérer la localisation correcte de ces ARNm, nous avons entrepris d'analyser l'impact de l'absence de FMRP en culture de neurones primaires de souris.

En collaboration avec B. Bardoni (CNRS, Nice), nous avons caractérisé un nouvel ARNm lié par FMRP, l'ARNm de l'enzyme superoxyde dismutase *SOD1*. L'équipe de B. Bardoni a observé que l'expression de la protéine superoxyde dismutase 1 codée par ce gène était diminuée dans le cerveau des souris déficientes en FMRP. Nous avons montré que l'ARNm *SOD1* ne contient pas de motif G-quartet et que FMRP se lie à un motif structuré en tige-boucle présent au niveau du site d'initiation de la traduction, et stimule la traduction de cet ARNm dans les neurones (Bechara *et al.*, 2009). Les anomalies d'expression de la protéine *SOD1* provoquée par l'absence de FMRP pourraient contribuer aux altérations du stress oxydatif observées dans le modèle *FMRI* KO de souris.

En collaboration avec l'équipe du Dr Willemsen et du Dr de Vrij (Rotterdam), nous avons examiné le rôle des différents domaines de FMRP dans la formation des granules neuronaux d'ARN (Levenga *et al.* 2009). Nous avons montré en particulier que la structure en G-quartet du mRNA *FMRI* n'est pas essentielle pour son incorporation dans ces granules.

Nous avons récemment réanalysé l'association proposée par plusieurs laboratoires entre FMRP et le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*). Nous avons montré que FMRP : 1) n'est pas nécessaire à l'activité RISC dans les cellules, 2) présente des propriétés de localisation intracellulaire et d'association aux polysomes distinctes de celles du complexe RISC. Nous concluons à une implication

de FMRP et RISC dans des voies fonctionnelles distinctes. FMRP contribuerait à l'efficacité de formation des granules de stress (Didiot *et al.*, 2009).

2) Myopathies myotubulaire et centronucléaires et analyse fonctionnelle de la voie des myotubularines (équipe dirigée par J. Laporte, avec A. Buj-Bello)

Les myopathies centronucléaires (CNM) regroupent des myopathies rares caractérisées par une grande proportion de fibres musculaires atrophiées à noyaux centraux (les noyaux étant normalement périphériques dans les fibres musculaires matures). Les CNM sont regroupées en trois classes, et nous avons participé à l'identification de tous les gènes impliqués jusqu'à présent. La forme liée au chromosome X, appelée myopathie myotubulaire, est la plus sévère et se traduit par une hypotonie généralisée qui entraîne souvent la mort du patient dans la première année. Elle est due à des mutations dans le gène *MTM1* codant pour la myotubularine (Laporte *et al.* 1996), dont nous avons par la suite montré qu'elle définit une nouvelle famille de phosphoinositides (PIs) phosphatases, agissant sur le PI3P et le PI3,5P2 (Blondeau *et al.* 2000, Laporte *et al.* 2003). Les formes autosomiques dominantes (ADCNM) débutent à l'adolescence ou à l'âge adulte, et sont généralement dues à des mutations de la dynamine 2 (*DNM2*), une protéine impliquée notamment dans les mécanismes d'endocytose et de trafic membranaire (Bitoun *et al.* 2005). Les formes infantiles autosomiques récessives (ARCNM) sont de sévérité intermédiaire et nous avons récemment montré que certaines familles sont porteuses de mutations dans le gène *BIN1* codant pour l'amphiphysine 2, une protéine interagissant avec la dynamine (Nicot *et al.* 2007). Ces trois protéines (myotubularine, amphiphysine 2 et dynamine 2) sont impliquées dans le remodelage et le trafic des membranes. L'activité myotubularine phosphatase permet la synthèse d'un phosphoinositide aux fonctions mal connues, le PI5P. Par une approche bioinformatique avec l'équipe d'O. Poch, étudiant la distribution de 32 protéines impliquées dans le métabolisme du PI5P dans 39 génomes eucaryotes séquencés, nous avons pu définir des groupes coévoluant de protéines correspondant à des complexes fonctionnels, et nous conduisant à proposer un rôle du PI5P dans le trafic membranaire des endosomes tardifs vers la membrane plasmique (Lecompte *et al.* 2008).

Nous avons poursuivi, en collaboration avec V. Biancalana (laboratoire hospitalier de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg) et des cliniciens, l'étude des mutations dans la dynamine 2 et l'amphiphysine 2, et tentons d'établir des corrélations génotype-phénotype. Nous avons caractérisé d'autres cas de CNM liés à des mutations dans le gène *BIN1*, confirmant l'implication de ce gène. Des études fonctionnelles sont en cours pour mieux comprendre l'impact de ces mutations. Nous avons aussi caractérisé des mutations de *DNM2* dans 36 nouvelles familles. Nous finalisons la comparaison entre génotype et phénotype afin d'identifier de possibles corrélations. Nous avons identifié le premier cas familial avec une mutation du domaine *Pleckstrin Homology* (PH) de la dynamine 2. L'atteinte est néonatale, donc initialement plus sévère que la forme classique. Le diagnostic moléculaire des formes autosomiques connues (liées à *BIN1* et *DNM2*)

est maintenant réalisé au laboratoire de diagnostic du CHU de Strasbourg. La caractérisation de nouveaux anticorps contre la myotubularine humaine nous permet de diagnostiquer rapidement la myopathie myotubulaire à partir de lignées cellulaires de patients car la plupart des mutations conduisent à une forte diminution du niveau de la protéine. Plusieurs patients présentant des phénotypes peu sévères et donc atypiques pour une myopathie myotubulaire ont été diagnostiqués par cette approche en western blot, et confirmés par séquençage du gène *MTM1*.

Nous avons accès à de nombreux patients non mutés dans les gènes connus et poursuivons la recherche de gènes impliqués dans les myopathies centronucléaires récessives en développant des approches à haut débit. Nous adaptons un protocole de capture de séquence sur puces ADN suivi de séquençage haut débit (Roche et Illumina) afin de rechercher des variations de séquence dans plusieurs milliers de gènes à la fois, dans un patient donné. Cette approche étant très coûteuse, des expériences de validations sont en cours sur un petit nombre de patients.

Nous essayons de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques menant aux myopathies centronucléaires à l'aide de plusieurs modèles animaux. Un mutant *mtm-1* de *Caenorhabditis elegans* montre plusieurs défauts incluant un positionnement anormal des noyaux dans les cellules de l'hypoderme, un phénotype retrouvé chez les patients dans le muscle ; ceci suggère un rôle primaire de la myotubularine dans le positionnement des organelles. Ce lien pourrait être en partie expliqué par le fait que nous retrouvons une interaction entre la myotubularine et la desmine, un filament intermédiaire impliqué dans le positionnement des organelles et muté dans des formes de myopathies myofibrillaires et des cardiomyopathies. La myotubularine interagit directement avec la desmine et en plus d'une localisation anormale des noyaux, plusieurs modèles cellulaires et animaux (*knock-down* et *knock-out* pour la myotubularine) montrent des défauts de localisation et fonction des mitochondries. Nos données permettent ainsi de relier au niveau moléculaire deux myopathies différentes. Ce travail sur la desmine a été effectué par Karim Hnia, titulaire d'un poste ATER Collège de France de 2007 à 2009.

Nous avons précédemment créé et caractérisé des modèles murins déficients en myotubularine (Buj-Bello *et al.* 2002, 2008), reproduisant la pathologie musculaire humaine, et qui ont permis d'éclairer les mécanismes de la myopathie myotubulaire. Dans la souris KO *MTM1*, nous avons récemment montré l'existence d'anomalies précoces de l'organisation des tubules T, également observées chez des patients atteints de myopathie myotubulaire. Dans le modèle souris, ces anomalies s'accompagnent d'anomalies du couplage excitation contraction, qui pourraient rendre compte de l'importante hypotonie musculaire observée chez les patients (Al-Qusairi *et al.* 2009 ; en collaboration avec Vincent Jacquemond de l'Université Lyon1). Dans les biopsies musculaires de patients, la localisation de BIN1, dont le rôle dans la maturation des tubules T avait déjà été suggéré, est anormale et s'accompagne d'anomalies de localisation ou d'expression d'autres protéines associées aux triades et au réticulum sarcoplasmique. Nous avons aussi étudié des biopsies musculaires provenant des

différentes formes de CNM (mutations dans MTM1, BIN1 et DNM2) et montrons des anomalies communes des tubules T, du réticulum et de la localisation de BIN1. Ces données suggèrent qu'un défaut de tubulation des membranes pourrait être le mécanisme commun à l'origine des myopathies centronucléaires. Des souris porteuses de mutations dans le gène BIN1 ont été construites à l'Institut clinique de la souris (ICS), dont nous allons initier la caractérisation phénotypique, et qui seront un outil précieux pour l'analyse des interactions fonctionnelles des protéines mutées dans les myopathies centronucléaires.

Nous avons aussi poursuivi une approche de thérapie génique à l'aide de vecteur AAV (*adeno-associated virus*) exprimant la myotubularine, en collaboration avec le Généthon (Evry). Nous avons précédemment rapporté que la réintroduction du gène MTM1 améliore notablement l'hypotonie musculaire et le phénotype histologique des souris KO_MTM1 (Buj-Bello *et al.* 2008). Nous reproduisons maintenant ce sauvetage avec des constructions basées sur un promoteur desmine ne s'exprimant que dans le muscle, afin de s'affranchir d'effets secondaires possibles et des résultats préliminaires suggèrent que certains gènes homologues à MTM1 (MTMRs) pourraient avoir un effet de sauvetage partiel. D'une façon plus générale, nous utilisons les vecteurs AAV pour manipuler et modifier la voie des CNM en exprimant des gènes sauvages, chimères MTM1-MTMR, mutants dominants négatifs, shRNA. Ce projet est assuré en partie par le Dr Belinda Cowling, qui occupera un poste ATER Collège de France à partir de septembre 2009.

3) Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl

(collaboration avec le Prof. H. Dollfus)

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), de transmission autosomique récessive, associe rétinite pigmentaire, obésité, polydactylie, anomalies rénales et atteinte cognitive. Il est caractérisé par une étonnante hétérogénéité génétique, contrastant avec la spécificité de la présentation clinique. De 2000 à 2005, 9 gènes (dénommés BBS1 à 9) avaient été identifiés, dont les mutations ne rendent compte que d'environ 50 % des patients. L'identification de ces gènes, codant pour des protéines de types très divers et dont les fonctions étaient initialement inconnues, a permis de relier le syndrome BBS à des défauts dans l'assemblage ou la fonction de structures ciliées (cil primaire) et du centrosome. Nous participons à une étude initiée par le Prof. Hélène Dollfus (faculté de médecine de Strasbourg), visant notamment à identifier de nouveaux gènes BBS. L'utilisation d'une approche de cartographie par homozygotie dans des familles consanguines, à l'aide de « puces SNP (*single nucleotide polymorphism*) », en collaboration avec l'équipe de bioinformatique d'Olivier Poch à l'IGBMC nous a permis d'identifier en 2005-2006 deux nouveaux gènes (BBS10 et BBS12) particulièrement importants car mutés chez plus de 25 % des patients (Stoetzel *et al.* 2006, 2007). Alors que 8 des 9 gènes BBS précédemment identifiés sont très conservés dans l'évolution, entre tous les organismes ciliés (de l'homme au nématode, et même à l'algue *Chlamydomonas*), les gènes BBS10 et BBS12 codent pour des protéines spécifiques des vertébrés et dont la séquence protéique évolue

rapidement. BBS10 et BBS12 appartiennent, comme BBS6 à la superfamille des chaperonines de type II (Stoetzel *et al.* 2007), et ces 3 gènes définissent une branche spécifique des vertébrés au sein de cette superfamille dont les autres membres ont une origine beaucoup plus ancienne (Stoetzel *et al.* 2007). Le phénotype indistinguable des patients porteurs de mutations dans des gènes BBS différents suggère que les protéines correspondantes pourraient être impliquées dans des complexes macromoléculaires (l'absence de l'un ou l'autre d'entre eux ayant alors le même effet négatif sur la fonction du complexe). Des travaux récents confirment une telle hypothèse pour 7 protéines BBS présentes de manière stoechiométrique dans un complexe nommé BBSome (Nachury *et al.* 2007). Les protéines BBS6, 10 et 12 sont absentes de ce complexe, et on peut donc faire l'hypothèse d'un complexe « chaperonin-like » qui contiendrait ces 3 protéines.

La création de mutants avec inactivation conditionnelle des gènes BBS10 et 12 chez la souris est en cours à l'ICCS, qui devraient notamment permettre de répondre au problème du mécanisme (central ou périphérique) de l'obésité liée aux mutations BBS. Des résultats récents obtenus par V. Marion et H. Dollfus indiquent que les protéines BBS et le cil primaire jouent un rôle important dans la différenciation des préadipocytes et dans l'adipogenèse (Marion *et al.* 2009).

La recherche de nouveaux gènes BBS se poursuit (il reste environ 25 % de patients ne correspondant à aucun des gènes connus). Les analyses effectuées sur des familles consanguines pour lesquelles le gène n'est pas encore identifié nous permettent d'exclure la présence d'un gène pouvant expliquer plus de 10 % des cas, et suggèrent une extrême hétérogénéité. Ceci complique l'identification de nouveaux gènes, en l'absence de grandes familles informatives, car il existe de nombreuses régions candidates (sur la base des études d'homozygotie) de grande taille, et contenant donc de très nombreux gènes. Nous avons notamment recherché la présence de petites délétions homozygotes chez des patients issus de familles consanguines, dans une vingtaine de familles avec syndrome de Bardet-Biedl et sans mutations dans les gènes connus en utilisant des « puces génomiques » contenant 1,8 millions de positions analysables (puces 6.0 d'Affymetrix). Nous avons mis au point des approches de diagnostic moléculaire s'appuyant sur la cartographie d'homozygotie avec des puces SNPs, utiles pour des maladies génétiquement très hétérogènes telles que le syndrome de Bardet-Biedl (Muller *et al.*, en préparation), ou les myopathies « des ceintures » (Cossée *et al.*, 2009).

Maladies à expansion de polyglutamine (Yvon Trottier, avec K. Mérienne)

L'équipe de Y. Trottier étudie la physiopathologie de la maladie de Huntington (MH) et l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7). Ces maladies neurodégénératives héréditaires sont dues à une expansion de répétitions CAG codant pour un homopolymère de glutamines (polyQ) dans des protéines cibles spécifiques de chaque maladie. L'expansion de polyQ (au-delà d'environ 39 résidus) altère les propriétés structurales de la protéine mutée, ce qui a pour effet de générer plusieurs

entités protéiques toxiques, et des fragments protéolytiques solubles ou agrégés sous diverses structures. Ceci perturbe graduellement les mécanismes essentiels à la fonction et la survie des neurones, avec une spécificité d'atteinte neuronale qui diffère selon la maladie.

L'équipe s'intéresse aux propriétés structurales des polyQ. En collaboration avec le Dr. A. Podjarny (IGBMC), nous cherchons à élucider la structure de la polyQ, un motif retrouvé dans un grand nombre de protéines, mais dont la fonction reste inconnue. La stratégie en cours consiste à déterminer la structure de polyQ de longueur déterminée interagissant avec un partenaire, en l'occurrence un anticorps monoclonal anti-polyQ, que nous avons caractérisé antérieurement (Trottier *et al.*, 1995, Trottier *et al.*, 2003, Klein *et al.*, 2007). Cette stratégie doit nous permettre de révéler la structure de la polyQ, mais aussi celle de l'anticorps, ce qui devrait fournir une base pour générer par modélisation des inhibiteurs de l'agrégation. Une autre étude vise à déterminer dans quelle mesure l'expansion polyQ altère les propriétés d'interaction de la huntingtine mutée avec ses partenaires. En effet, plusieurs études proposent qu'un défaut d'interaction de la huntingtine menant à la dysfonction des interacteurs contribuerait à la pathogenèse. Est-ce que les défauts d'interaction résultent d'une anomalie structurale de la huntingtine mutée ou de sa propension à s'agréger demeure une question importante pour orienter les stratégies thérapeutiques. Pour répondre à cette question, nous étudions, en collaboration avec le Dr. D. Altschuh (ESBS, Illkirch), les propriétés d'interaction de la huntingtine par calorimétrie et résonance plasmonique de surface (BIAcore), des techniques biophysiques de haute précision, jamais utilisées à ce jour pour caractériser les interactions de la huntingtine.

Il est généralement admis que la toxicité induite par les expansions polyQ initie une cascade d'événements dégénératifs menant à la mort neuronale. Cependant, comment les neurones répondent à la toxicité induite par les polyQ *in vivo* reste largement inconnu. Pour adresser cette question, nous avons profité d'un modèle de souris transgénique SCA7 que nous avons généré antérieurement et qui exprime l'ataxine-7 mutée uniquement dans les photorécepteurs de la rétine, modélisant ainsi la rétinopathie des patients SCA7 (Yvert *et al.* 2000, Abou-Sleymane *et al.* 2006, Helmlinger *et al.* 2006). Ce modèle offre la possibilité d'étudier les effets toxiques à long terme de l'ataxine-7 mutée car la survie de la souris n'est pas compromise. Nous avons découvert que la réponse des photorécepteurs à la toxicité de l'ataxine-7 mutée est multiple et oriente les photorécepteurs vers des destins radicalement opposés tels la mort apoptotique rapide ou non-apoptotique lente, la migration cellulaire, la différenciation ou plus remarquable encore, la prolifération. Certaines prédestinations (apoptose et prolifération) accompagnent les stades précoces de la rétinopathie, alors que d'autres (migration, mort non-apoptotique et différenciation) sont responsables des stades tardifs. De façon remarquable, un certain équilibre entre des réponses de mort et de survie (prolifération et différenciation) a pour effet de maintenir l'intégrité de la couche des photorécepteurs, mais pas la fonctionnalité de la rétine. La diversité de la réponse

neuronale à la toxicité des polyQ est conceptuellement très importante pour le développement des stratégies thérapeutiques. De plus, nos résultats montrent la remarquable plasticité des photorécepteurs soumis aux stress toxiques, et soulève une question fascinante à savoir si les photorécepteurs peuvent se redifférencier et redevenir fonctionnels (résultats soumis pour publication).

Avec K. Mérienne, nous nous sommes intéressés à l'instabilité somatique de l'expansion CAG dans la maladie de Huntington (HD), car celle-ci pourrait en partie expliquer la sélectivité striatale de l'atteinte neuronale. En effet, l'instabilité s'accroît avec l'âge avec une forte tendance à augmenter en taille la répétition CAG/polyQ, et donc à conférer plus de toxicité à la huntingtine. Cette instabilité est particulièrement importante dans le striatum, la cible principale de la dégénérescence, et elle est faible dans le cervelet, un tissu peu atteint. Le mécanisme d'instabilité n'est pas connu, mais une étude récente propose l'implication des lésions oxydantes des CAG et d'une enzyme réparant ces lésions, OGG1. En étudiant un modèle souris HD, nous avons montré que des lésions oxydantes s'accumulent sur l'expansion CAG, mais ces lésions n'augmentent pas avec l'âge et sont comparables dans le striatum et le cervelet. Toutefois, l'étude du niveau d'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la réparation des lésions oxydantes (le *Base Excision Repair* [BER]) révèle des différences intéressantes entre le striatum et le cervelet. L'endonucléase *flap* FEN1, qui est impliqué dans une activité spécifique du BER (*Long-Patch* [LP] BER), et l'activité endonucléasique *flap* sont fortement diminuées dans le striatum en comparaison au cervelet. À l'inverse, une analyse par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), indique que la DNA Polymérase β est fortement enrichie sur l'expansion CAG, uniquement dans le striatum. La POL β et la FEN1 fonctionnent de paire dans l'activité LP-BER, la première en polymérisant l'ADN et en causant un déplacement de brin, la seconde en coupant ce brin *flap* pour terminer la réparation. Nous proposons qu'un défaut de stœchiométrie de ces enzymes dans le striatum pourrait générer des structures anormales du brin CAG *flap*, à l'origine de l'instabilité somatique (Goula *et al.* 2009). Quel est le mécanisme impliqué dans la réparation de ces structures et comment crée-t-il des répétitions CAG de taille variable restent à élucider.

Physiopathologie de l'ataxie de Friedreich (équipe H. Puccio)

L'équipe de H. Puccio s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de l'ataxie de Friedreich (AF), par la construction et l'étude de modèles murins et de modèles cellulaires.

L'ataxie de Friedreich est une maladie autosomique récessive, gravement invalidante, caractérisée par une dégénérescence spino-cérébelleuse et une cardiomyopathie hypertrophique. Elle est due à la diminution quantitative d'une protéine mitochondriale, la frataxine, qui entraîne un déficit fonctionnel des protéines à noyau fer-soufre (Fe-S) et une accumulation intramitochondriale de fer. Cette équipe a créé depuis plusieurs années des modèles souris de l'ataxie de

Friedreich, par inactivation conditionnelle spatio-temporelle (système Cre-Lox) du gène de la frataxine (Puccio *et al.* 2001 ; Simon *et al.* 2004). Ces modèles conditionnels reproduisent l'essentiel des caractéristiques physiopathologiques et biochimiques de la pathologie humaine. Ces modèles murins ont permis de montrer non seulement que le déficit en protéine à centre Fe-S était une conséquence primaire au déficit en frataxine et que l'accumulation de fer était secondaire, mais aussi que la frataxine est nécessaire pour la biogenèse d'enzymes Fe-S nucléaires et cytosoliques (Martelli *et al.* 2007).

Le Dr. Hélène Puccio est lauréate d'un « ERC Starting Grant 2007 » pour un projet de 5 ans intitulé « ISCATAxia : Unraveling the molecular mechanisms leading to cellular dysfunction in diseases linked to defects in mitochondrial iron-sulfur metabolism. »

Mécanismes moléculaires dans la pathogénèse de l'ataxie de Friedreich : l'implication du stress oxydant (Guillon *et al.*, 2009)

Notre analyse de l'évolution moléculaire et biochimique de la cardiomyopathie murine liée à l'absence de frataxine nous a permis de montrer que l'accumulation de fer était secondaire et était précédée par la déficience des enzymes Fe-S (Puccio *et al.* 2001), remettant ainsi en cause les hypothèses initiales sur la fonction de la frataxine. Nous avons ensuite montré que ce défaut en enzymes Fe-S était une conséquence primaire, et non une conséquence de stress oxydant majeur (Seznec *et al.* 2004, 2005). La diminution de l'expression et de l'activité des enzymes de détoxification (MnSod et Cu, ZnSod) (Chantrel-Groussard *et al.* 2001 ; Seznec *et al.* 2005), est probablement une conséquence d'une baisse de production de superoxyde due à une chaîne respiratoire fortement réduite. En accord avec cette hypothèse, le modèle murin « humanisé » avec une chaîne respiratoire moins réduite présente des marqueurs d'un stress oxydant. Récemment, l'équipe du Dr. Cécile Bouton a mis en évidence une augmentation de l'expression et de l'activité de la Lon protéase à partir de 8 semaines dans les mutants inactivant le gène frataxine dans le cœur (mutants MCK). Cette protéase mitochondriale ATP-dépendante a plusieurs fonctions proposées, et notamment participe à la défense contre le stress oxydant en dégradant des protéines faiblement oxydées, dont l'aconitase mitochondriale, prévenant leur accumulation en agrégats. Nos résultats, ainsi que ceux du Dr. Bouton, sur l'expression de différentes protéines à noyau Fe-S mitochondriales (m-aconitase, ferrochelatase, SDHB, NDUFS3) montrent une diminution d'expression progressive de ces enzymes dans les cœurs des souris MCK à partir de la 5^e semaine. Ces résultats suggèrent que les enzymes Fe-S, qui ont tendance à se dégrader en absence d'un centre Fe-S, sont des substrats de la Lon protéase (Guillon *et al.* 2009).

Modèles cellulaires pour l'ataxie de Friedreich

Les lignées cellulaires de patients sont peu utiles pour des analyses biochimiques car phénotypiquement normales puisqu'elles sont issues de cellules épargnées par

la maladie (lymphoblastes et fibroblastes). L'établissement de lignées cellulaires directement à partir des souris constitue donc un excellent système pour étudier les anomalies biochimiques liées à l'absence totale de frataxine, donc plus sévère, ainsi que pour un criblage à grande échelle de molécules potentiellement thérapeutiques.

1. *Knock-down* (Calmels *et al.*, BMC Neurology 2009)

Afin de contourner la létalité induite par l'absence totale de frataxine, une nouvelle stratégie a été mise en œuvre, visant à reproduire le déficit quantitatif en frataxine, afin de se rapprocher de la situation observée chez les patients (taux résiduel de frataxine inférieur à 20 %). La stratégie choisie a été l'expression d'un ribozyme dirigé contre l'ARNm de la frataxine murine dans des fibroblastes murins hétérozygotes ne possédant que 50 % du taux normal de frataxine. Par cette stratégie, nous avons obtenu deux lignées clonales avec un taux fortement réduit en frataxine, qui présentaient initialement un défaut de prolifération cellulaire et une diminution de 50 % des activités des enzymes à noyau Fe/S (aconitases et complexe II de la chaîne respiratoire). Malheureusement, une étude de stabilité au cours du temps a montré que les deux clones ont compensé partiellement leur phénotype, par un mécanisme non élucidé, avec une restauration partielle de l'expression de frataxine et une absence du déficit en protéine Fe-S, tout en conservant certaines caractéristiques moléculaires de l'ataxie de Friedreich, dont une croissance diminuée sans addition de stress exogène. Ces modèles cellulaires ont été utilisés pour cribler une chimiothèque d'un millier de composés à la recherche de molécules capables de restaurer le déficit de croissance lié au défaut de frataxine (en collaboration avec la plateforme de criblage du Génopole de Strasbourg). Malgré l'absence d'identification de composé actif, cette étude démontre la faisabilité de l'approche et soulève les limites des modèles cellulaires déficients en frataxine.

2. *Modèles humanisés* (Calmels, Schmucker, *et al.*, 2009)

La mutation majoritaire chez les patients FRDA est une expansion trinuécléotidique (GAA)_n située dans le premier intron du gène de la frataxine. Quelques patients (4 %) sont hétérozygotes composites, porteurs d'une mutation ponctuelle sur un allèle du gène *FXN* et de l'expansion sur l'autre allèle. Nous avons mis en place une stratégie d'inactivation complète du gène murin de la frataxine par utilisation d'une recombinase fluorescente et d'un allèle conditionnel (EGFP-Cre/LoxP). Alors que l'inactivation complète de la frataxine dans des fibroblastes immortalisés entraîne un phénotype létal, l'expression transgénique de différents variants de frataxine humaine porteurs de mutations faux-sens (G130V et I154F) permet de restaurer la viabilité des cellules totalement déficientes en frataxine murine endogène. Ces premiers modèles cellulaires porteurs de mutations faux-sens présentent un phénotype spontané spécifique de la pathologie (déficit d'activités des protéines Fe-S

mitochondriales et extramitochondriales, accumulation mitochondriale de fer, sensibilité au stress oxydant exogène) dont la gravité est corrélée à la sévérité clinique observée chez les patients hétérozygotes composites (phénotype classique pour I154F, atypique et modéré pour G130V). Ces modèles constituent de nouveaux outils pour la compréhension du rôle de la frataxine d'une part et pour l'identification de molécules potentiellement thérapeutiques d'autre part. De plus, la stratégie EGFP-Cre/LoxP constitue un test fonctionnel efficace pour évaluer la capacité de la frataxine ou d'autres protéines à restaurer la viabilité des cellules entièrement déficientes en frataxine endogène (Schmucker *et al.* 2008).

Modélisation de l'ataxie de Friedreich par le développement de cellules souches pluripotentes induites portant des expansions (GAA)_n pathogéniques

La dérivation de cellules pluripotentes (iPS) à partir de cellules somatiques représente une stratégie innovante pour la mise en place de modèles cellulaires pour les maladies génétiques. Cette stratégie représente un enjeu majeur pour l'ataxie de Friedreich. En effet, la mutation majoritaire (96 % des patients) est une expansion (GAA)_n intronique conduisant à une hétérochromatisation du locus. Or, le caractère instable du (GAA)_n rend la génération de modèles murins et cellulaires portant un (GAA)_n très compliqué. À l'heure actuelle, le meilleur modèle murin avec expansion (GAA)_n ne présente pas d'ataxie sévère. Nous avons créé des modèles murins par recombinaison homologe ainsi que des modèles cellulaires. Malgré les réelles avancées apportées dans la compréhension de l'AF, ces modèles ne reproduisent pas l'anomalie moléculaire majoritairement en cause. L'obtention de cellules iPS pour l'AF permettra d'obtenir des cellules génétiquement identiques aux patients avec la capacité à se différencier en divers types cellulaires. En collaboration avec l'équipe du Prof. S. Viville (IGBMC), nous avons généré les premières lignées de cellules iPS à partir de fibroblastes d'une patiente AF adulte ((GAA)_{n=800 et 600}) et d'un individu contrôle. Entre 30 et 60 jours post transduction, 8 clones ont été obtenus pour la lignée contrôle et 5 pour la lignée AF. La taille des expansions a été contrôlée. Le (GAA)_n est instable mais reste à une taille pathogénique (n = 500 à 900). Les clones obtenus ont les caractéristiques morphologiques de cellules ES, expriment de façon endogène les marqueurs de pluripotence, sont positifs pour la phosphatase alcaline et peuvent se différencier en corps embryoides (EB). L'analyse de l'expression de gènes exprimés dans chacun des trois feuilletts embryonnaires est actuellement en cours sur ces EB. Nos résultats démontrent que les clones obtenus sont des cellules souches induites. La reprogrammation d'une deuxième lignée AF est en cours. Deux à trois clones par lignée seront choisis pour une caractérisation plus approfondie: profil transcriptionnel, état d'inactivation du chromosome X dans les lignées XX, état épigénétique du locus de la frataxine, taille du (GAA)_n. Les iPS seront différenciées en cardiomyocytes et neurones qui seront caractérisés pour identifier les voies affectées et des biomarqueurs, ainsi que pour tester des molécules augmentant le taux de frataxine.

Génétique moléculaire des ataxies récessives (équipe M. Koenig)

L'équipe avait précédemment identifié les gènes impliqués dans des formes d'ataxie avec apraxie oculomotrice (AOA1/gène aprataxine en 2001 ; AOA2/gène senataxine en 2004) ainsi que dans une forme d'ataxie cérébelleuse pure (ARCA2/gène ADCK3 en 2008). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation des cassures simples brin de l'ADN, dans la terminaison et la maturation des ARN et dans la synthèse du coenzyme Q10, respectivement. L'identification du gène AOA2 avait permis de définir cette nouvelle entité clinique. Depuis, l'analyse d'une grande cohorte patients AOA2 confirmés par l'identification de mutations du gène de la sénataxine nous a permis de mieux définir cette entité et de reconnaître qu'elle correspond à la troisième forme d'ataxie récessive la plus fréquente en Europe puisqu'elle est presque aussi fréquente que l'ataxie-télangectasie (Anheim *et al.* 2008, Tazir *et al.* 2009, Gazulla *et al.* 2009, Anheim *et al.* 2009a, Anheim *et al.* 2009b).

Nous avons également analysé une famille consanguine d'Arabie Saoudite, avec trois sœurs atteintes d'une nouvelle forme d'ataxie récessive et 5 enfants sains. Les patients présentent une ataxie cérébelleuse précoce débutant avant l'âge de 7 ans, des difficultés à la marche et de langage et une dysarthrie. Ils ne présentent aucune spasticité ni de neuropathie périphérique. Cependant, 2 patients présentaient précocement une épilepsie bien traitée et sans rechute après l'âge de 3 ans et un retard mental modéré. Le génotypage des trois sœurs sur puces Affymetrix GeneChip 10K et le génotypage du reste de la famille à l'aide de marqueurs microsatellites sur des loci ciblés nous a permis de localiser le gène responsable dans un intervalle de 10 Mb en 3qter. Le séquençage de l'ensemble des gènes cet intervalle nous a permis d'identifier une seule mutation, une délétion d'un seul nucléotide (2927delC), au niveau de l'exon 19 du gène KIAA0226. Ce gène code pour une protéine de 108 KDa que nous avons baptisée rudataxine (RUN-DAG-ataxine) car l'analyse bioinformatique a révélé la présence de 2 domaines: un domaine RUN et un domaine C-terminal très conservé riche en cystéines et contenant un motif potentiel de liaison au diacylglycérol (motif DAG). Les domaines RUN sont en général impliqués dans les voies de signalisation liées aux petites GTPases Ras-like et dans l'interaction des protéines avec le cytosquelette. Au niveau protéique, la mutation (p.Ala875ValfsX146) crée une nouvelle phase de lecture de 146 acides aminés et entraîne l'absence du motif DAG. L'homologue le plus proche de la rudataxine est la pleckstrine M1 (PLEKHM1) puisqu'elle est la seule à avoir à la fois un domaine RUN et le même motif de liaison potentielle au DAG. Des mutations de la PLEKHM1 sont responsables d'une forme intermédiaire d'ostéopétrose humaine et d'un modèle spontané d'ostéopétrose avec absence d'incisives chez le rat. PLEKHM1 colocalise avec Rab7, un marqueur des endosomes tardifs, ce qui suggère une fonction dans le transport vésiculaire au niveau des ostéoclastes. Cette homologie, ainsi que l'homologie avec les protéines RUFY (RUN-FYVE), suggère que la rudataxine serait également impliquée dans le trafic vésiculaire. Ces données ont été présentées oralement au congrès de l'European

Society of Human Genetics et font l'objet d'un article en cours de préparation. Nous avons également produit des anticorps polyclonaux contre des peptides de la rudataxine, afin de déterminer la localisation subcellulaire de la rudataxine. Ces études permettront de déterminer si la rudataxine participe à des voies physiopathologiques communes avec les autres protéines du cytoplasme impliquées dans des ataxies récessives (sacine, SYNE1, SIL1...) ou si elle est impliquée dans une nouvelle voie physiopathologique responsable d'ataxie.

Syndrome de Coffin-Lowry et kinase RSK2 (équipe A. Hanauer)

L'équipe étudie les bases moléculaires du syndrome de Coffin-Lowry (retard mental syndromique lié au chromosome X, comportant notamment des anomalies squelettiques progressives) et le rôle de la kinase RSK2 mutée dans ce syndrome et de ses homologues RSK1, 3 et 4. Des souris invalidées pour le gène RSK2 ont été créées précédemment par l'équipe. Elles présentent un retard de croissance osseuse (Yang *et al.*, 2004), des anomalies de la dentition (manuscrit en cours de préparation) et des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (Poirier *et al.* 2006). L'équipe a récemment mis en évidence des anomalies de la voie dopaminergique au niveau du cortex de ces souris (Marques Pereira *et al.*, 2008). Elle vient de montrer que le taux de phosphorylation de ERK1/2 était significativement plus élevé dans le cortex des souris KO pour RSK2 que dans le cortex de souris WT de mêmes fratries. De façon inattendue cette hyperphosphorylation s'accompagnait d'une altération de sa localisation nucléaire dans le cortex des souris mutées. Ces altérations ont également été mises en évidence dans des fibroblastes de patients atteints du syndrome de Coffin-Lowry, suggérant qu'il pourrait s'agir d'une dérégulation plus générale de la voie ERK non limitée aux neurones corticaux. Basées sur des études de l'expression des différentes phosphatases connues d'ERK1/2, notamment les DUSP (*Dual specificity phosphatases*), dans les fibroblastes de patients, nos résultats suggèrent qu'un déséquilibre de la balance entre phosphatases nucléaires et cytoplasmiques pourrait être à la base de la séquestration de phospho-ERK1/2 dans le cytoplasme des fibroblastes des patients. Les résultats obtenus par surexpression ou au moyen de siRNA confortent notre hypothèse (manuscrit en préparation).

À partir de cultures primaires hippocampiques, l'équipe a analysé la croissance et la morphologie des épines dendritiques et la régulation de différents acteurs de la voie de signalisation des MAPK intervenant dans la plasticité synaptique. Cette étude a révélé une augmentation significative de la densité d'épines matures le long des dendrites des neurones KO, et une diminution de la densité des synapses excitatrices (marquages avec PSD95). Ces résultats suggèrent une altération de la maturation des épines dans les neurones RSK2-KO, ce qui pourrait influencer la plasticité synaptique. Cette observation a conduit l'équipe à étudier l'expression et l'activation de gènes cibles de la voie Ras/MAPK (impliqués dans la plasticité synaptique) en réponse à une stimulation par le glutamate. Ces études ont de nouveau révélé une augmentation du taux de Phospho-ERK1/2 dans les cellules KO

ainsi qu'une diminution de phospho-CREB. Ce niveau anormal de phosph-ERK a pour conséquence une altération de la phosphorylation des autres RSKs ainsi que de ELK1, un facteur de transcription activé par ERK1/2. Ces études confirment donc une modification de l'activité transcriptionnelle dans les neurones hippocampiques déficients pour RSK2, pouvant expliquer en partie les altérations morphologiques identifiées. Les études en cours visent à faire le lien entre ces altérations transcriptionnelles et les anomalies de maturation des épines dendritiques.

L'équipe a par ailleurs collaboré à une étude portant sur les conséquences de l'inactivation de RSK2 pour la croissance axonale des motoneurones. Cette étude a montré que la survie de motoneurones (spinaux) de souris KO-RSK2 en culture était normale, mais que les axones avaient une longueur significativement plus importante que les axones de motoneurones WT. La surexpression d'une forme constitutivement active de RSK2 dans les motoneurones conduisait, au contraire, à une réduction de la croissance axonale. Comme dans le cadre de notre étude sur le système dopaminergique, une augmentation de 30-40 % de l'activité de ERK1/2 a aussi été constatée dans les motoneurones déficients pour RSK2 par rapport à des motoneurones WT. Finalement, en appliquant un inhibiteur pharmacologique de MEK à des cultures de motoneurones déficients pour RSK2, l'excès de croissance axonale a pu être corrigé. L'ensemble des résultats suggère que dans des conditions physiologiques normales RSK2 régule négativement l'allongement des axones via la voie de signalisation MAPK/ERK. Une dérégulation de la croissance des neurites pourrait ainsi contribuer au déficit fonctionnel du système nerveux des patients CLS et des souris déficientes pour RSK2. Ces résultats ont été rapportés dans une publication qui vient d'être acceptée dans le *Journal of Cell Biology* (Fisher *et al.*, 2009). Les études en cours portent sur la croissance des neurites de neurones corticaux et hippocampiques, ainsi que sur la morphogénèse de leurs épines dendritiques.

Finalement, une comparaison des transcriptomes d'hippocampe de souris invalidées pour RSK2 et de souris sauvages a été réalisée. Elle a révélé des différences d'expression significatives pour 90 gènes. La validation d'une dizaine de ces gènes par RT-PCR quantitative et par Western-blot a été réalisée, qui confirment les résultats des puces Affymétrie. Parmi les gènes validés dont l'expression est nettement augmentée dans l'hippocampe de souris déficientes pour RSK2, on trouve notamment celui codant pour la sous-unité GluR2 du récepteur ionotrope AMPA. Étant donné le rôle important du récepteur AMPA dans la transmission et la plasticité synaptique, l'équipe a entrepris des études fonctionnelles sur des cultures primaires de neurones afin de déterminer l'influence de la surexpression de GluR2 sur ces fonctions.

Réarrangements génomiques dans les tumeurs solides (équipe S. du Manoir)

Le Dr. du Manoir développe des stratégies d'étude des réarrangements chromosomiques (amplifications, délétions) des tumeurs solides par « CGH array »

et analyse du transcriptome pour identifier des gènes impliqués dans le phénotype tumoral et/ou des marqueurs associés à l'agressivité tumorale.

Sox2 un nouvel oncogène activé dans les carcinomes épidermoïdes bronchiques du poumon

Nous avons démontré un rôle oncogénique pléiotropique du gène SOX2 dans les cancers à petites cellules du poumon (SCC). Le locus du gène SOX2 est fréquemment amplifié (environ 20 %) ou en gain de copies (60-80 %) dans les cancers du poumon épidermoïdes. Il s'agit d'un des locus les plus fréquemment amplifiés (premier ou deuxième site) sur l'ensemble du génome. Au niveau protéique, 67 % des tumeurs avancées présentent un marquage nucléaire (collaboration avec E. Brambilla, Grenoble). *In vitro*, le niveau d'expression de SOX2, module le phénotype tumoral : sa surexpression dans des lignées épithéliales de poumon normal et de cancers stimule la migration cellulaire et la capacité à proliférer en agar ; l'inhibition de son expression induit la mort de ces mêmes cellules par apoptose. Finalement, la greffe de cellules épithéliales bronchiques sur-exprimant SOX2 de manière ectopique conduit à la formation de tumeurs *in vivo* (à la différence des cellules contrôles). Ces tumeurs sont généralement d'histologie épidermoïde et peu différenciées.

Nous avons conduit une analyse comparative des transcriptomes de tumeurs primaires, de cellules épithéliales bronchiques normales surexprimant SOX2 et de cellules souches embryonnaires pour évaluer l'impact transcriptionnel de SOX2. Une telle approche de méta-analyse intégrative représente une stratégie puissante pour révéler les processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le phénotype tumoral. Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, l'activation de programmes (signatures) transcriptionnels caractéristiques des cellules souches embryonnaires (Ben-Porath *et al.*, 2008 ; Wong *et al.*, 2008) dans les SCC du poumon, qui ont été corrélés à un pronostic vital péjoratif dans d'autres types de tumeurs épithéliales (Ben-Porath *et al.*, 2008 ; Wong *et al.*, 2008). Nous avons aussi montré que SOX2 contribue à l'établissement d'un transcriptome de type « cellules souches » dans ces cancers, qui pourrait participer à la perte de différenciation des cellules cancéreuses lors de la progression tumorale.

Finalement, nous avons généré une liste de 16 gènes dérégulés (en particulier des caspases et de la voie TRAIL) dans notre modèle de surexpression de SOX2 et dans les tumeurs primaires. Ces gènes sont des candidats pour médier le pouvoir oncogénique de SOX2 dans les cancers épidermoïdes (Hussenet T. *et al.*, en révision à PloS Genetics, 2009).

Nous pensons que l'activation de SOX2 est un événement central dans la carcinogenèse des SCC. SOX2 pourrait moduler plusieurs traits moléculaires aboutissant à un phénotype tumoral plus agressif. L'implication de SOX2 dans le développement embryonnaire et l'homéostasie du poumon ouvre des perspectives pour l'identification de la cellule d'origine des SCC qui est encore incertaine.

Finalement, son rôle central dans la régulation des cellules souches ouvre des perspectives sur l'identification de cellules souches cancéreuses pulmonaires et l'activation de programmes transcriptionnels de type cellules souches embryonnaires ou adultes dans ces tumeurs.

Recherche de marqueurs génomiques (et protéiques) prédictifs du pronostic vital dans des cancers du poumon de stade I-II

(collaboration N. Martinet et J.-M. Vignaud)

Nous avons participé à une étude longitudinale sur une cohorte de 1200 patients atteint de cancers bronchiques et opérés à Nancy entre 1998 et 2008 (Vlastos *et al.*, 2009). Ce travail fait apparaître que l'amélioration de la survie stade-spécifique au cours de cette période est associée à la généralisation de chimiothérapies post-opératoires. L'introduction de chimiothérapies péri-opératoires, ciblées sur la base des caractéristiques biologiques des tumeurs, participant à l'élimination des cellules disséminées, représente une opportunité réelle pour les cancers bronchiques de stades précoces. Cette étude confirme que 30 à 40 % des patients ayant un cancer bronchique de stade précoce (cancers bronchiques non à petites cellules, NSCLC, stade I) meurent suite à des récurrences (Vlastos *et al.*, 2009 et Hoffmann *et al.*, 2000) sans éléments pronostiques disponibles. Ces récurrences sont très probablement dues à la dissémination antérieure de cellules tumorales micrométastatiques qui ne sont pas détectables au moment de l'exérèse de la tumeur primaire (Martini *et al.*, 1995).

Nous avons construit deux études rétrospectives (Adénocarcinomes/ADC : 73 cas et cancers épidermoïdes/CEB : 76 cas) de stade I-II stratifiées en deux groupes (survie < 25 mois et > 60 mois) afin de rechercher des marqueurs génomiques (par CGH-Array) pronostiques associés au décès par récurrence. Plusieurs régions de gains et pertes sont trouvées statistiquement et préférentiellement associées au pronostic péjoratif. En particulier, deux régions sont communes aux deux histologies (ADC et CEB). Nous avons sélectionné dans ces régions 4 gènes candidats sur la base de leur implication connue ou possible dans la biologie du cancer (mais pas dans les cancers du poumon) et leur expression est en cours d'analyse par immunohistochimie dans des séries tumeurs primaires humaines en relation avec le pronostic vital (J.-M. Vignaud). Nous réaliserons une caractérisation fonctionnelle de la contribution de ces gènes (et d'autres gènes issus de notre criblage génomique/transcriptomique) à l'agressivité tumorale *in vitro* et *in vivo*, par des tests de formation de micrométastases dans des xénogreffes utilisant une plateforme innovante (lentivirus et imagerie *in vivo* ; T. Hussenet).

Cette étude a le potentiel d'identifier des marqueurs génomiques et protéiques prédictif du pronostic vital pour les cancers bronchiques de faible stade. D'un point de vue cognitif, elle pourrait mettre en évidence des gènes (et voies de signalisation) impliqués dans la récurrence dans les cancers du poumon de faible stade.

Développement d'outils pour l'analyse des expériences de CGH *array* et de puces SNP

Nous sommes impliqués dans un programme visant à faciliter l'interprétation de données de CGH sur puces pour des patients souffrant de retards mentaux (programme DHOS en collaboration avec P. Jonveaux, Nancy), et dans le cadre d'une action du GIS maladies rares. Bondo Monga a développé un logiciel installé dans le laboratoire de Philippe Jonveaux à Nancy et utilisé de façon routinière pour l'analyse de l'ensemble des cas (plus de 500 cas en 2008-2009). Le processus d'analyse est ainsi automatisé et l'interprétation facilitée pour le clinicien. Lors du traitement par le logiciel PecamoreSAS d'un cas, les données sont automatiquement stockées dans une base de données interne et pourront être exploitées ultérieurement pour identifier de nouveaux CNVs et des aberrations récurrentes.

RESPONSABILITÉS DE J.-L. MANDEL

DANS LE DOMAINE SCIENTIFIQUE ET DISTINCTIONS

Jean-Louis Mandel a assuré jusqu'au 1^{er} octobre 2009 la fonction de directeur adjoint de l'IGBMC, est directeur (jusqu'en décembre 2009) de l'Institut clinique de la souris (ICS). En décembre 2008 il a été élu président de la Fondation Jean Dausset-Centre d'étude du polymorphisme humain et président du conseil scientifique de la Fondation ELA (European Leucodystrophy Association). Il a été nommé représentant du Collège de France au conseil scientifique de la Fondation Louis Jeantet (Genève), et a été élu en juin 2009 membre correspondant de l'Académie nationale de médecine.

PUBLICATIONS DU GROUPE DE GÉNÉTIQUE HUMAINE DE L'IGBMC

(depuis juillet 2008)

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture

Al-Qusairi L., Weiss N., Toussaint A., Berbey C., Messaddeq N., Kretz C., Sanoudou D., Beggs A., Allard B., Mandel J.L., Laporte J., Jacquemond V. & Buj-Bello A., « T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase », *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 2009, 106(44), 18763-8.

Anheim M., Lagier-Tourenne C., Stevanin G., Fleury M., Durr A., Namer I.J., Denora P., Brice A., Mandel J.L., Koenig M. & Tranchant C., « SPG11 spastic paraplegia: a new cause of juvenile parkinsonism », *Journal of Neurology*, 2009, 256, 104-108.

Anheim M. (a), Monga B., Fleury M., Charles P., Barbot C., Salih M., Delaunoy J.-P., Fritsch M., Arning L., Synofzik M., Schöls L., Sequeiros J., Goizet C., Marelli C., Le Ber I., Koht J., Gazulla J., De Bleecker J., Mukhtar M., Drouot N., Ali-Pacha L., Benhassine T., Chbicheb M., M'Zahem A., Hamri A., Chabrol B., Pouget J., Murphy R., Watanabe M., Coutinho P., Tazir M., Durr A., Brice A., Tranchant C. & Koenig M., « Ataxia with oculomotor apraxia type 2 : clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients », *Brain*, 2009, 132, 2688-2698.

Anheim M. (b), Fleury M., Monga B., Laugel V., Chaigne D., Rodier G., Ginglinger E., Boulay C., Courtois S., Drouot N., Fritsch M., Delaunoy J.-P., Stoppa-Lyonnet D., Tranchant

C., Koenig M., « Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France : implications for clinical management », *Neurogenetics*, 2010, 11(1), 1-12.

Bechara E.G., Didiot M.C., Melko M., Davidovic L., Bensaid M., Martin P., Castets M., Pognonec P., Khandjian E.W., Moine H., Bardoni B., « A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation », *PLoS Biol.*, 2009, Jan 20, 7(1) : e16.

*Calmels N., *Schmucker S., Wattenhofer-Donzé M., Martelli A., Vaucamps N., Reutenauer L., Messaddeq M., Bouton C., Koenig M., Puccio H., « The first cellular models based on frataxin missense mutations that reproduce spontaneously the defects associated with Friedreich ataxia », *PlosOne*, 2009, Jul 24, 4(7) : e6379 (*equal contribution).

Calmels N., Seznec H., Villa V., Reutenauer L., Hibert M., Haiech J., Rustin P., Koenig M. & Puccio H., « Limitations in a frataxin knockdown cell model for Friedreich ataxia in a high-throughput drug screen », *BMC Neurology*, 2009, Aug 24, 9, 46.

Cossée M., Lagier-Tourenne C., Seguela C., Mohr M., Leturcq F., Gundesli H., Chelly J., Tranchant C., Koenig M. & J.-L. Mandel., « Use of SNP array analysis to identify a novel TRIM32 mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2H », *Neuromuscular Disorders*, 2009, 19, 255-260.

Didiot M.C., Subramanian M., Flatter E., Mandel J.L. & Moine H., « Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly », *Mol. Biol. Cell.*, 2009, 19, 428-437.

Fischer M., Marques Pereira P., Holtmann B., Simon C.M., Hanauer A., Heisenberg M., Sendtner M., « P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons », *Mol. Cell. Neurosci.*, 2009, 42, 134-41.

Gazulla J., Benavente I., López-Fraile I.P., Modrego P., Koenig M., « Sensorimotor neuropathy in ataxia with oculomotor apraxia type 2 », *Muscle Nerve*, 2009, 40, 481-485.

Goula A.V., Berquist B.R., Wilson D.M. 3rd, Wheeler V.C., Trottier Y. & Merienne K., « Stoichiometry of base excision repair proteins correlates with increased somatic CAG instability in striatum over cerebellum in Huntington's disease transgenic mice », *PLoS Genet.*, 2009, 5(12) : e1000749.

Guillon B., Bulteau A.L., Wattenhofer-Donzé M., Schmucker S., Friguet B., Puccio H., Drapier J.C. & Bouton C., « Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins », *FEBS Journal*, 2009, 276, 1036-1047.

Kang S., Elf S., Dong S., Hitosugi T., Lythgoe K., Guo A., Ruan H., Lonial S., Khoury H. J., Williams I.R., Lee B.H., Roesel J.L., Karsenty G., Hanauer A., Taunton J., Boggon T. J., Gu T.L. & Chen J., « Fibroblast growth factor receptor 3 associates with and tyrosine phosphorylates p90 RSK2, leading to RSK2 activation that mediates hematopoietic transformation », *Mol. Cell. Biol.*, 2009, 29, 2105-2117.

Levenga J., Buijsen R.A., Rifé M., Moine H., Nelson D.L., Oostra B.A., Willemsen R., de Vrij F.M., « Ultrastructural analysis of the functional domains in FMRP using primary hippocampal mouse neurons », *Neurobiol Dis.*, 2009, 35, 241-250.

Marion V., Stoetzel C., Messaddeq N., Koch M., Danse J.M., Mandel J.-L. & Dollfus H., « Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome (BBS) proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, 106, 1820-1825.

McCrea H.J., Kretz C., Laporte J. & Ment L.R., « Dementia in a child with Myotubular Myopathy », *Pediatr. Neurology*, 2009, 40(6), 483-485.

Tazir M., Ali-Pacha L., M'Zahem A., Delaunoy J.P., Fritsch M., Nouioua S. Benhassine T., Assami S., Grid D., Vallat J.M., Hamri A. & Koenig M., « Ataxia with oculomotor apraxia type 2 : a clinical and genetic study of 19 patients », *J. Neurol. Sc.*, 2009, 278, 77-81.

Vergne I., Roberts E., Elmaoued R.A., Tosch V., Delgado M.A., Proikas-Cezanne T., Laporte J., Deretic V., « Control of autophagy by phosphoinositides 3-phosphatase Jumpy », *EMBO J.*, 2009, 28, 2244-2258.

Vlastos F., Lacomme S., Wild P., Poulain S., Siat J., Grosdidier G., du Manoir S., Monga B., Hillas G., Varsovie R., Claudot F., Marie B., Vignaud J.M. & Szymanski N., « Do evolving practices improve survival in operated lung cancer patients ? A biobank may answer », *J. Thoracic Oncol.*, 2009, 4, 505-511.

Anheim M., Fleury M.C., Franques J., Moreira M.C., Delaunoy J.P., Stoppa-Lyonnet D., Koenig M. & Tranchant C., « Clinical and molecular findings of Ataxia with oculomotor apraxia type 2 in 4 families », *Arch. Neurol.*, 2008, 65, 7, 958-962.

Bui-Bello A., Fougousse F., Schwab Y., Messaddeq N., Spehner D., Pierson C.R., Durand M., Kretz C., Danos O., Douar A.M., Beggs A.H., Schultz P., Montus M., Denèfle P. & Mandel J.-L., « AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis », *Hum. Mol. Genet.*, 2008, 17, 2132-2143.

Cao C., Backer J.M., Laporte J., Bedrick E.J. & Wandinger-Ness A., « Sequential Actions of Myotubularin Lipid Phosphatases Regulate Endosomal PI(3)P and Growth Factor Receptor Trafficking », *Mol. Biol. Cell*, 2008, 19, 3334-3346.

Didiot M.C., Tian Z., Schaeffer C., Subramanian M., Mandel J.L., Moine H., « The G-quartet containing FMRP Binding Site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer », *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 4902-4912.

Lecompte O., Poch O., Laporte J., « PtdIns5P regulation through evolution: role in membrane trafficking ? », *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(10), 453-460.

Marques Pereira P., Gruss M., Braun K., Foos N., Pannetier S., Hanauer A., « Dopaminergic system dysregulation in the mrsk2_KO mouse, an animal model of the Coffin-Lowry syndrome », *J. Neurochem.*, 2008, 107, 1325-1334.

Nicot A.S. & Laporte J., « Endosomal phosphoinositides and human diseases » (Review), *Traffic*, 2008, 9, 1240-1249.

Schmucker S., Argentini M., Carelle-Calmels N., Martelli A., Puccio H., « The *in vivo* mitochondrial two-step maturation of human frataxin », *Human Molecular Genetics*, 2008, 17, 3521-3531.

Stehling O., Netz D.J., Niggemeyer B., Rösser R., Eisenstein R.S., Puccio H., Pierik A.J., Lill R., « The human Nbp35 is essential for both cytosolic iron-sulfur protein assembly and iron homeostasis », *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28, 5517-5528.

Articles de synthèse, chapitres de livres, etc.

Merienne K. & Trottier Y., « Perspective : SCA8 CAG/CTG expansions, a tale of two TOXICities: a unique or common case? », *PLoS Genetics*, 2009, 5(8) : e1000593.

Puccio H., « Multicellular models of Friedreich Ataxia », *Journal of Neurology*, 2009, 256,18-24.

Rohde H.M., Tronchère H., Payrastré B. & Laporte J., « Detection of myotubularin phosphatases activity on phosphoinositides in vitro and ex vivo », *Methods Mol. Biol.*, 2009, 462, 265-78.

Jungbluth H., Wallgren-Pettersson C., Laporte J., « Centronuclear (myotubular) myopathy », *Orphanet J. Rare Dis.*, 2008, 3(1), 26.

Ogata T., Laporte J., Fukami M., « *MAMLD1 (CXorf6)* : a new gene involved in hypospadias », *Hormone Research*, 2009, 71(5), 245-252.

Hanauer A., « Coffin-Lowry Syndrome », *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, 2008.

CONFÉRENCES ET PARTICIPATION À DES CONGRÈS DE J.-L. MANDEL
(DEPUIS JUILLET 2008)

- Congrès international de génétique ophtalmologique et rétinoblastome (ISGEDR) (Strasbourg), 28 au 30 août 2008, *modérateur de session*.
- International Mouse Phenotyping Consortium (Toronto), 17 et 18 novembre 2008, « The Institut Clinique de la Souris (ICS) », *présentation orale*.
- 38^e journées de la société française de Médecine Périnatale (Strasbourg), 15 au 17 octobre 2008, « Réflexions sur la médecine prédictive », *conférencier*.
- Congrès francophone annuel de diabétologie (ALFEDIAM) (Strasbourg), du 17 au 20 mars 2009, *modérateur session*.
- 25th anniversary Symposium on Genomics and Medicine, Fondation Jean Dausset – CEPH (Paris), 23 et 24 mars 2009, « Contributions of monogenic diseases to functional genomics », *conférencier*.
- Génétique de l'évolution/en évolution : journée scientifique en l'honneur de Josué Feingold (Paris), le 18 juin 2009, « Les maladies à expansion de triplets, 18 ans après : des anomalies de transmission familiale aux mécanismes pathologiques et aux stratégies thérapeutiques », *conférencier*.

BREVETS

BBS10 related diagnostic methods and reagents for Bardet-Biedl syndrome.

Date of filing : 23.02.07, Priority : US/23.02.06/USP 776188.

Applicant : The Johns Hopkins University *et al.* (dont Université de Strasbourg).

Identification of the most common gene for Bardet-Biedl syndrome.

Katsanis N., Dollfus H., Mandel J.L., Lewis R.

PARTICIPATION À DES PROJETS EUROPÉENS

Consortium européen « Myotubularinopathies », financé par un projet E-Rare et regroupant A. Bolino, B. Payrastré et le groupe « myopathies centronucléaires », 2008-2010.

H. Puccio a obtenu en 2008 un « starting grant » de l'ERC (European Research Council) de 5 ans pour ses travaux intitulés : Unraveling the molecular mechanisms leading to cellular dysfunction in diseases linked to defects in mitochondrial iron-sulfur cluster metabolism.

Gencodys (Genetic and epigenetic networks in cognitive dysfunction), projet retenu pour financement (FP7); implication dans la création et la caractérisation de souris mutantes modèles de retards mentaux monogéniques.

En tant que directeur de l'Institut clinique de la souris (ICS), Jean-Louis Mandel a participé activement aux projets européens de génomique fonctionnelle de la souris : EUCOMM (Production de souris avec inactivation conditionnelle de gènes, FP6), EUMODIC (Phénotypage systématique de souris avec inactivation de gène, FP6), EMMA Service (archivage et distribution de mutants de souris créés et analysés dans les projets précédents, FP7), CREATE (Coordination de la production et caractérisation de souris exprimant spécifiquement dans des tissus/cellules spécifiques une recombinase Cre, FP7), et à la phase initiale du projet d'infrastructure européenne (ESFRI) dans le domaine du phénotypage, archivage et distribution de souris mutantes (INFRAFRONTIER).