

## Génétique humaine

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

### ENSEIGNEMENT

#### **Cours 1 : Maladies à expansions instables de répétitions polynucléotidiques**

Une série de quatre cours (14 et 21 novembre 2012) a été consacrée à ce thème d'une très grande actualité et qui concerne des maladies génétiques neurologiques et musculaires importantes<sup>a</sup>. Si le syndrome du retard mental avec X fragile, première maladie pour laquelle ce mécanisme mutationnel d'expansion instable avait été identifié en 1991, avait été abordé sous divers aspects en 2004, 2009 et 2011, et la myotonie dystrophique en 2005, les autres pathologies relevant de ce mécanisme n'avaient pas été traitées dans mes cours. J'ai abordé principalement des résultats majeurs publiés récemment tels que l'implication dans une forme assez fréquente de sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot), les travaux sur les mécanismes pathogéniques et l'implication de mécanismes épigénétiques, et enfin quelques approches de stratégies thérapeutiques.

Le premier cours a introduit l'aspect historique de la notion d'anticipation dans la myotonie dystrophique, dont la réalité biologique avait été niée pendant près de 70 ans, et la succession de découvertes, de 1991 à 2011 de maladies liées à des expansions instables. On peut classer ces maladies en fonction de la localisation génique, de la stabilité et de l'effet fonctionnel de ces expansions, en trois grandes catégories : maladies avec perte de fonction du gène cible (perte plus ou moins complète de l'expression de la protéine, dans le syndrome X fragile ou l'ataxie de Friedreich), et les maladies avec gain de propriété toxique (appelé souvent gain de fonction) soit au niveau protéine (maladie de Huntington et autres maladies à expansion de polyglutamine) soit au niveau ARN messager ou transcrit complet (myotonie dystrophique, syndrome FXTAS ou *fragile X tremor ataxia syndrome*). Mais d'autres mécanismes pourraient jouer un rôle, impliquant des ARN antisens ou des anomalies de traduction protéique

---

a. Cette première série de cours est disponible en vidéo sur le site Internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/jean-louis-mandel/course-2012-2013.htm> [Ndlr].

(*Repeat Associated Non-ATG Translation Initiation* ou *RAN translation*, Zu *et al.* PNAS 2010). Les mécanismes d'instabilité ont été brièvement évoqués, et notamment le rôle inattendu du système de « *mismatch-repair* », et en particulier du gène MSH3, qui joue un rôle mutateur. Une découverte récente très importante est celle de la mutation par expansion d'une répétition hexanucléotidique non codante comme cause de la forme génétique la plus fréquente de sclérose latérale amyotrophique (dégénérescence des motoneurones) pure ou associée à une démence fronto-temporale, rapportée dans plusieurs articles publiés simultanément fin 2011. Le gène cible de la mutation (C9ORF72) a une fonction inconnue et le mécanisme (gain de propriété toxique ou perte de fonction) reste encore controversé. Une autre observation intéressante est la contribution d'un autre locus (ATXN2) avec répétition CAG/polyglutamine comme facteur de risque (mais non causal) de la SLA. Deux autres expansions instables ont été retrouvées comme responsables de formes très rares d'ataxies spino-cérébelleuses (SCA31 et SCA36) retrouvées dans la population japonaise. Le deuxième cours a porté sur les maladies où l'expansion entraîne une perte d'expression de la protéine, syndrome de retard mental avec X fragile (protéine FMRP) et ataxie de Friedreich (déficit partiel en une protéine mitochondriale, la frataxine). En ce qui concerne l'X fragile, ce sont surtout les travaux à visée thérapeutique, partant des modèles souris et drosophile et allant vers des essais cliniques (publiés en 2011 et 2012) d'antagonistes de récepteurs glutamate (mGluR5) ou d'un agoniste de GABA<sub>B</sub>, qui ont été présentés. L'ataxie de Friedreich a fait l'objet de la fin du 2<sup>e</sup> et du début du 3<sup>e</sup> cours, où ont été présentés les mécanismes épigénétiques impliqués dans l'inhibition de l'expression du gène frataxine, et qui sont étudiés comme cibles thérapeutiques potentielles. De nombreux essais cliniques pharmacologiques sont en cours ou proposés, mais j'ai surtout présenté les travaux de thérapie génique de l'équipe d'Hélène Puccio, réalisés à l'IGBMC sur un modèle souris de la pathologie cardiaque de cette maladie, et qui paraissent très prometteurs (cf. résumé des travaux de l'équipe d'Hélène Puccio ci-dessous).

Les cours 3 et 4 de cette série ont été consacrés aux expansions entraînant un gain de propriété toxique, soit au niveau protéique (maladies à expansion de répétitions polyglutamines) soit au niveau ARN. Neuf maladies neurodégénératives sont causées par des expansions de polyglutamine dans des protéines différentes, et diffèrent par la spécificité de l'atteinte principale pour des régions du cerveau, et donc par leurs manifestations cliniques, la maladie de Huntington étant la plus fréquente et la plus connue. Il s'agit d'un domaine de recherche très actif (400 publications par an !). Des mécanismes physiopathologiques très divers, impliquant différents compartiments cellulaires, ont été proposés sur la base d'études de modèles cellulaires ou de modèles dans la souris ou la drosophile, pour expliquer la toxicité des polyglutamines. Cette diversité supposée de mécanismes va de pair avec un nombre de cibles thérapeutiques potentielles et quelques résultats « thérapeutiques » encourageants sur les modèles souris ou drosophile, mais pas dans les quelques essais cliniques réalisés. La difficulté réside dans le fait de modéliser dans des organismes de laboratoire une pathologie qui prend plus de 30 ou 40 ans pour produire ses effets néfastes, et d'autre part, au plan des essais cliniques, de mesurer des effets sur des pathologies lentement et irrégulièrement progressives. J'ai ainsi évoqué le rôle dans la pathogénicité de la tendance à l'agrégation des expansions de polyglutamine, des mécanismes d'autophagie, ou de modulations épigénétiques. Une approche thérapeutique générique pour l'ensemble de ces maladies serait l'inhibition de l'expression de la protéine mutante (sans affecter la protéine normale), et ceci a été atteint dans des systèmes-

modèles par l'utilisation d'ARN antisens stimulant des mécanismes de type RNAi (cf. par exemple Yu *et al.*, *Cell* 2012). La dernière partie de cette série de cours a été consacrée aux mécanismes des pathologies avec ARN toxiques. Pour la myotonie dystrophique, s'il y a un accord général sur l'implication d'anomalies de l'épissage alternatif de plusieurs gènes importants, rendant compte de manifestations cliniques majeures (dont la myotonie), les travaux récents de Nicolas Charlet à l'IGBMC (voir ci-dessous) ont montré une implication d'anomalies de métabolisme d'un microARN (miR-1), pouvant expliquer des manifestations cardiaques de la maladie (Rau *et al.*, 2011). L'utilisation de modèles cellulaires isogéniques (cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation par expansion dans le gène DM1) permet d'analyser de manière en principe fidèle les mécanismes pathologiques et de chercher des molécules correctrices (travaux à iSTEM, Evry, Marteyn *et al.*, *Cell Stem Cell* 2011) ; et pour cette pathologie également, une approche de type antisens pour inhiber l'expression de l'ARN toxique a été utilisée de diverses manières dans des modèles cellulaires et de souris (travaux de C. Thornton et de L. Garcia). Le dernier sujet abordé fut celui du *Fragile X tremor ataxia syndrome*, lié à la prémutation du gène FMR1, et dont il fallut dix ans pour découvrir l'implication dans une maladie neurodégénérative de début tardif (par P. et R. Hagerman). Des travaux récents élégants de l'équipe de Nicolas Charlet montrent l'implication dans les mécanismes pathologiques de protéines impliquées dans l'épissage ou dans le métabolisme des microARN (SAM68 et DROSHA-DGCR8, cf. ci-dessous).

## Cours 2 : Maladies génétiques et empreinte génomique parentale

Une série de 4 cours (20 mars et 27 mars 2013) a porté sur une série de maladies où le phénomène épigénétique d'empreinte parentale joue un rôle capital : syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, et syndromes de Beckwith-Wiedemann et Silver-Russell<sup>b</sup>. Le rôle éventuel et moins établi de l'empreinte parentale dans la variabilité phénotypique des syndromes de Turner et Klinefelter a également été évoqué, ainsi que les travaux suggérant un effet modeste mais réel de la procréation médicalement assistée sur le risque de maladies liées à l'empreinte génomique. En introduction, j'ai rappelé que la notion d'empreinte parentale est dérivée de travaux d'embryologie expérimentale et de génétique sur la souris, menés par A. Surani, D. Solter et B. Cattanach, et publiés en 1984-85, montrant la non-équivalence des génomes autosomiques paternels et maternels. Ce domaine de recherche est devenu très actif à partir des années 1990, avec l'identification de régions homologues du génome soumises à empreinte parentale chez la souris et l'homme, et leur implication dans des pathologies génétiques humaines. Des recherches fondamentales visent à étudier les mécanismes d'établissement et d'effacement de l'empreinte, impliquant notamment des enzymes de méthylation de l'ADN (Dnml1, Dnmt3a et 3L). D'autres travaux plus théoriques analysent le rôle évolutif de ce mécanisme chez les mammifères, avec notamment l'hypothèse du conflit darwinien parental, énoncée initialement en 1991 par T. Moore et D. Haig, concernant la croissance de l'embryon, l'échange de nutriments entre mère et fœtus, et peut être aussi le comportement

---

b. Cette seconde série de cours est disponible en vidéo sur le site Internet du Collège de France : [http://www.college-de-france.fr/site/jean-louis-mandel/course-2012-2013\\_\\_1.htm](http://www.college-de-france.fr/site/jean-louis-mandel/course-2012-2013__1.htm) [Ndlr].

maternel vis-à-vis des nouveau-nés. L'essentiel de cette série de cours a porté sur les mécanismes en cause dans les quatre pathologies citées ci-dessus, impliquant deux régions du génome soumises à empreinte parentale chez l'homme et la souris.

Les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman sont des maladies neurodéveloppementales très dissemblables et pourtant, elles peuvent être causées par les mêmes mécanismes (délétion ou disomie uniparentale), mais conduisant dans le cas de Prader-Willi à l'absence d'une copie paternelle de la région impliquée du chromosome 15 (15q11.2-q13), et, dans le cas d'Angelman, par l'absence de la copie maternelle. Mais si le syndrome d'Angelman est lié à une anomalie d'expression d'un seul gène dans cette région (UBE3A, codant pour une ubiquitine protéine ligase), la situation est plus complexe pour celui de Prader-Willi, impliquant un cluster de gènes codant pour des snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), mais peut-être aussi du gène codant pour la protéine necline, tous présents dans cette région. Les travaux, tant chez l'homme que chez la souris, ont mis en évidence l'importance majeure d'un centre de contrôle de l'empreinte (ICR) dans cette région et de l'expression d'ARN antisens de grande taille. Des résultats majeurs concernant ces mécanismes ont été obtenus par la comparaison de lésions génomiques particulières chez des patients, et de modèles souris spécifiques obtenus par recombinaison homologue. Là aussi, la possibilité récente de créer des cellules souches pluripotentes (iPSC) à partir de fibroblastes de patients apporte de nouveaux outils très prometteurs.

Les cours 3 et 4 ont porté principalement sur deux autres maladies avec des phénotypes cliniques opposés (en miroir) liés à des anomalies génétiques ou épigénétiques touchant la région 11p15 (équivalente à la région distale du chromosome 7 de la souris). Le syndrome de Beckwith-Wiedemann est un syndrome de croissance excessive avec des anomalies de développement (notamment omphalocèle) et prédisposant à des tumeurs d'origine embryonnaire. Il est lié dans 2/3 des cas à des anomalies épigénétiques (épimutations) de cette région, mais peut être aussi causé par une isodisomie uniparentale paternelle, des microdélétions ou des duplications, et par des mutations du gène CDKN1C, gène majeur pour les mécanismes physiopathologiques. Le syndrome de Silver-Russell associe un retard de croissance débutant en période anténatale et une asymétrie fréquente des membres. Il est lié dans une forte proportion des cas à des anomalies de méthylation du gène H19 correspondant à un long ARN non-codant, mais il peut être aussi causé par une isodisomie uniparentale maternelle ou par des microduplications maternelles. Curieusement, alors que l'implication du locus 11p15 dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann était connue depuis 1983, il a fallu attendre les travaux de C. Gicquel et Y. Le Bouc en 2005 pour réaliser que cette région était également impliquée dans la moitié des cas de syndrome de Silver-Russell. La régulation de l'expression des gènes et de l'effet des empreintes parentales est d'une complexité extrême, qui a été détaillée dans le cours, faisant intervenir des gènes à expression sur le chromosome maternel (H19, CDKN1C) ou paternel (un très long ARN antisens KCNQ1OT1, et IGF2 codant pour un facteur de croissance), deux centres de régulation d'empreinte (IC1 et IC2), l'action de la protéine CTCF qui a un effet majeur sur la structure de la chromatine. Les travaux ont bénéficié de la grande homologie structurale et fonctionnelle entre le locus humain et le locus murin homologue. Le gène H19 avait été identifié chez la souris en 1990 comme correspondant à un transcrit ARN non codant très abondant et soumis à empreinte parentale, mais dont la fonction est restée inconnue jusqu'à des travaux récents montrant qu'il agit comme réservoir d'un microARN miR-675 impliqué dans la

régulation de la croissance placentaire (Cai *et al.*, 2007 et surtout Keniry *et al.*, 2012). Les caractéristiques fonctionnelles et évolutives de cette région correspondent bien à l'hypothèse du « conflit parental ». Un aspect plus appliqué, qui a suscité de grandes inquiétudes, a été initié par des observations épidémiologiques indiquant une plus grande fréquence de syndrome de Beckwith-Wiedemann associé aux techniques de procréation médicalement assistée (lié à une hypométhylation localisée de l'allèle maternel). Ceci avait généré des inquiétudes quant à un effet possible sur d'autres pathologies liées à l'empreinte qui n'a pas été confirmé. Le cours s'est clos sur la discussion de possibles effets d'empreinte parentale touchant le chromosome X sur l'expression de phénotypes, notamment comportementaux, chez les patients atteints de syndrome de Turner (45 X) ou de Klinefelter (47XXY). Toutefois, après une publication (Skuse *et al.*, *Nature* 1997) qui avait suscité beaucoup d'intérêt et de discussions, et la découverte en 2005 de gènes du chromosome X de souris pouvant correspondre à un tel mécanisme (mais non retrouvés chez l'homme), il s'agit actuellement d'un domaine controversé avec des résultats apparaissant contradictoires.

### **Colloque : *Epigenetic mechanisms and genetic diseases***

Colloque co-organisé avec le Pr. Edith Heard, chaire Épigénétique et mémoire cellulaire

Ce colloque d'un jour et demi (en anglais) a réuni treize conférenciers prestigieux (9 travaillant à l'étranger, 4 en France) et des interventions plus courtes de deux jeunes chercheurs français. Il s'est déroulé le 21 mai et la matinée du 22, dans l'amphithéâtre Guillaume Budé et a été suivi par une très nombreuse assistance, avec des discussions très actives. Il incluait des exposés sur des mécanismes épigénétiques fondamentaux (méthylation de l'ADN, modifications d'histone, inactivation du chromosome X, longs ARN non codants) et sur des effets intergénérationnels liés notamment à la nutrition et au métabolisme, correspondant à l'enseignement du Pr. Edith Heard, ainsi que des exposés sur les mécanismes épigénétiques et d'empreinte parentale dans des maladies génétiques correspondant plus particulièrement au programme d'enseignement de la chaire de génétique humaine (syndrome de Rett, maladies héréditaires et acquises liées au gène ATRX ou à d'autres gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine et intervenant dans des déficiences intellectuelles, l'ataxie de Friedreich, les maladies de croissance fœtale liées au locus 11p15). Le colloque s'est conclu sur une passionnante conférence du Pr Elizabeth Blackburn (prix Nobel de médecine et physiologie) sur les télomères et leur implication en pathologie humaine. Neuf posters ont été également présentés par de jeunes chercheurs au cours d'une session très animée.

La liste des conférences dans l'ordre de présentation est : Adrian Bird, Wellcome Trust Centre for Cell Biology, Edinburgh, Royaume-Uni : « The molecular basis of Rett syndrome » ; Doug Higgs, MRC Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, et John Radcliffe, Hospital, Oxford, Royaume-Uni : « The role of the ATRX/DAXX/H3.3 chromatin remodeling complex in inherited and acquired human genetic disease » ; Annette Schenck, Donders Institute for Brain, Dept. Human Genetics, Nijmegen, Pays-Bas : « Modelling Intellectual Disability in Drosophila – from the clinics to the epigenetic regulation of learning and memory » ; Richard Festenstein, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College School of

Medicine, Londres, Royaume-Uni : « Overcoming epigenetic silencing in Friedreich's ataxia - a novel therapy? » ; Anne Ferguson-Smith, University of Cambridge, Dept. of Physiology, Development and neuroscience, Cambridge, Royaume-Uni : « Intergenerational epigenetic programming of metabolic defects in a mouse model of undernutrition » ; Deborah Bourc'his, Institut Curie, Genetics and Developmental Biology Department, CNRS UMR 3215, Inserm U 934, Paris : « Short and long-term influences of maternally inherited DNA methylation » ; Paul Monnier, Institut Cochin, Genetics and Development Department, Inserm U 1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris : « The H19 locus: regulatory function of an imprinted non coding RNA in embryonic development » ; Robert Feil, Institute of Molecular Genetics (IGMM), CNRS et Université de Montpellier : « Genomic Imprinting: Epigenetic mechanisms and clinical implications » ; Anne Valerie Gendrel, Mammalian Developmental Epigenetics Group (E. Heard), Genetics and Developmental Biology Unit, Institut Curie, CNRS UMR 3215, INSERM U 934, Paris : « Random monoallelic gene expression in development and disease » ; Claire Rougeulle, UMR 7216, Épigénétique et destin cellulaire, université Paris Diderot, Paris : « Controlling X-chromosome activity by long non-coding RNAs » ; Stephan Beck, UCL Cancer Institute, Londres, Royaume-Uni : « Insights from playing pinball with the cancer methylome » ; Oliver Rando, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Mass., États-Unis : « Dietary effects on the sperm epigenome » ; Christine Gicquel, Epigenetics in Human Health and Disease, Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Victoria, Australia : « Human 11p15-related fetal growth disorders: models for the study of genomic imprinting » ; Robert Schneider, IGBMC, CNRS-université de Strasbourg, Inserm, Illkirch-Strasbourg : « Towards a causative role of histone modifications » ; Elizabeth Blackburn, Department of Biochemistry and Biophysics, University of California at San Francisco, San Francisco, Californie : « Telomere DNA: a curious category combining genomic and epigenetic properties ».

Des résultats non publiés ayant été présentés, il n'était pas possible de filmer les conférences, mais le programme incluant les résumés des conférences et des posters est disponible sur le site du Collège de France.

### Autres enseignements

Master de physiopathologie cellulaire et moléculaire, module génétique humaine (M1), université de Strasbourg, « Génétique multifactorielle » (4 heures, 16 novembre 2012) ; IGBMC international PhD Programme « The sequencing explosion and its effect on understanding of human pathologies » (2 heures, 4 février 2013) ; École supérieure de biotechnologie de Strasbourg, 2<sup>e</sup> année, module de bioéthique « Séquençage et génotypage haut débit : quelles applications médicales et problèmes éthiques associés » (1 h 30, 7 mai 2013) ; 4th Advanced course on constitutional and acquired cytogenetic : how diagnostic is changing, Gène (Italie) 19-21 juin 2013. « The fragile X syndrome, 70 years after Martin and Bell : from mutation to pathophysiology and therapeutic approaches » (1 heure) ; « Strategy for diagnostic application of NGS in intellectual disability » (1 heure) ; Universidade do Minho (Braga, Portugal), Health Sciences School : *Course on Intellectual Disability: from clinic to gene and back* », 1-7 juillet 2013 « Fragile X syndrome » (1 heure) ; « Next Generation Sequencing for diagnostic purposes » (1 heure).

## PUBLICATIONS

**Publications originales**

M'hamdi O., Redin C., Stoetzel C., Ouertani I., Chaabouni M., Maazoul F., M'rad R., Mandel J.L., Dollfus H., Muller J., Chaabouni H. (2013) Clinical and genetic characterization of Bardet-Biedl syndrome in Tunisia: defining a strategy for molecular diagnosis. *Clin Genet*. [doi: 10.1111/cge.12129].

Piton A., Poquet H., Redin C., Masurel A., Lauer J., Muller J., Thevenon J., Herenger Y., Chancenotte S., Bonnet M., Pinoit J.M., Huet F., Thauvin-Robinet C., Jaeger A.S., Le Gras S., Jost B., Gérard B., Peoc'h K., Launay J.M., Faivre L., Mandel J.L. (2013) 20 ans après : a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *Eur J Hum Genet*. Oct 30 [doi: 10.1038/ejhg.2013.243].

Piton A.\*, Redin C.\*, Mandel J.L. (2013) XLID-Causing Mutations and Associated Genes Challenged in Light of Data From Large-Scale Human Exome Sequencing. *American Journal of Human Genetics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.013> (recommandé deux fois par Faculty of 1000).

Redin C., Le Gras S., Mhamdi O., Geoffroy V., Stoetzel C., Vincent M.C., Chiurazzi P., Lacombe D., Ouertani I., Petit F., Till M., Verloes A., Jost B., Chaabouni H.B., Dollfus H., Mandel J.L., Muller J. (2012) Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. *J Med Genet*. 2012 Aug, 49(8):502-12 [doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100875].

Pour les publications en co-auteur avec les équipes 2, 5 et 6 du Groupe de génétique humaine de l'IGBMC, voir section Activités de recherche du laboratoire.

## AUTRES ACTIVITÉS

**Conférences invitées**

École d'été ITMO neurosciences « recherche translationnelle en neurosciences », Bordeaux, du 20 au 23 septembre 2012 : « Médecine personnalisée : mythe ou réalité ».

Colloque franco-québécois sur Orphanet, le portail des maladies rares et des médicaments orphelins. Montréal, le 12 octobre 2012 : « Organisation du diagnostic moléculaire des maladies génétiques en France et 1ère expérience du séquençage à haut débit » (conférence de clôture).

CIHR (Canadian Institute of Health Research), Orphanet Rare Diseases Research Day, Montréal, le 13 octobre 2012 : « Extreme heterogeneity of genetic causes of intellectual disability » (conférence d'ouverture).

2<sup>e</sup> journée de formation doctorale organisée par les écoles doctorales sciences de la vie et sciences humaines et sociales, perspectives européennes, le 24 octobre 2012 à Strasbourg, Connaissance scientifique et réflexion éthique : « Aspects éthiques en génétique humaine ».

2<sup>e</sup> forum recherche pour les associations de maladies rares : du diagnostic personnalisé aux thérapies personnalisées, organisé par l'AFM le 24 octobre 2012 à Versailles. « Omique et maladies rares de nouveaux enjeux éthiques ».

Journée scientifique sur les troubles du spectre de l'autisme (TSA), Strasbourg, 26 octobre 2012 : « Gènes de retard mental et gènes d'autisme : complexité, applications diagnostiques à l'ère du séquençage à très haut débit ».

Séminaire « Pour une base de données clinico-génétiques de patients avec déficit cognitif sur un modèle réseau social et 23andMe », le 20 novembre 2012 (organisé par le Campus numérique des systèmes complexes de Strasbourg).

Symposium Cartagena – Interactive Biosoftware - Nouvelles technologies en diagnostic génétique. Le 11 décembre 2012 à Paris : « Next generation sequencing pour le diagnostic de maladies génétiques hétérogènes ».

Lausanne Genomics Days Symposium, les 14 et 15 février 2013 : « Complexity of genetic causes of intellectual disability and related neurodevelopmental disorders: consequences for personalized medical care ».

Organisation d'un mini-colloque transdisciplinaire dans le cadre de l'Institute of Advanced Studies de l'université de Strasbourg (USIAS) : « La perception musicale : de la psychologie aux neurosciences et (prochainement) à la génétique », le 18 mars 2013. Avec les Pr Isabelle Peretz (U. de Montreal, chaire de Neurocognition de la musique), et Emmanuel Bigand (chaire IUF Musique-cognition-cerveau, Université de Bourgogne) et conférence de J.L. Mandel sur « L'identification de gènes impliqués dans la perception sensorielle ».

Congrès national de la Société française de dépistage néonatal, Paris le 4 avril 2013 : « La place du dépistage des hétérozygotes chez les couples ayant un projet parental ».

8<sup>th</sup> international meeting on CNVs and genes in intellectual disability and autism (Troina, Sicile), 12-13 avril 2013 : « How to deal with the highly complex genetics of intellectual disability and autism, to improve medical care and treatments of patients » (*keynote closing lecture*).

111<sup>e</sup> congrès de psychiatrie et de neurologie de langue française (CPNLF) du 4 au 7 juin 2013 à Strasbourg (conférence de prestige) : « Génétique et neuropsychiatrie : mutations causales ou facteurs de risque ? De la clinique au gène, du gène à la clinique et une médecine "personnalisée" ? ».

45<sup>e</sup> European Human Genetics Conference (ESHG 2013) à Paris, du 8 au 11 juin 2013, *chairman* du symposium « Evolution of organs », le 9 juin.

## Conférences et activités grand public

Université du Temps libre de Strasbourg, le 30 novembre 2012 : « La génétique dans la médecine d'aujourd'hui et de demain : diagnostic anticipé, traitement ».

3<sup>e</sup> forum européen de bioéthique de Strasbourg (FEBS), « Le corps humain en pièces détachées » à Strasbourg, du 28 janvier au 2 février 2013. J.L. Mandel est président et cofondateur du FEBS avec le Pr Israel Nisand. Cette 3<sup>e</sup> édition avait inscrit à son programme 21 débats avec 140 intervenants et une douzaine d'autres manifestations (forum jeune avec des lycéens, projections de films suivis de débat, manifestations culturelles du Forum Culture) rassemblant au total près de 12 000 auditeurs. Cette année, le forum a été couvert par France Culture. J.L. Mandel a participé comme intervenant à la rencontre-débat « Fabriquer la vie, les ingénieurs du vivant », le 2 février, et à 2 débats sur les thèmes du forum (dont un avec plusieurs classes de lycées) à Mulhouse, le 24 janvier.

Auditorium des musées de Strasbourg, le 11 mai 2013, « Une conférence de saison : les asperges, les gènes, et Édouard, Marcel, Jean-Jacques et les autres. Une promenade sinueuse et très illustrée à travers littérature, 2000 ans d'art, génétique humaine et médecine » ; conférence redonnée en anglais à l'IGBMC le 24 mai 2013 : « A seasonal conference : Asparagus, genes, Édouard, Marcel, Jean-Jacques and the others ».

Programmation France Culture « Éloge du savoir » : diffusion le 12 juillet 2013 de l'entretien de J.L. Mandel avec Christine Goémé du 11 juin 2013.



## Responsabilités

Jean-Louis Mandel est membre du conseil d'administration de la fondation Jean Dausset-Centre d'étude du polymorphisme humain (Paris) et du conseil scientifique de la fondation ELA (European Leucodystrophy Association). Il est représentant du Collège de France au conseil scientifique de la fondation Louis Jeantet (Genève). Il a été nommé en 2012 membre de l'Institute of Advanced Study de l'Université de Strasbourg (USIAS), chaire de Génétique humaine, et en 2013 membre du comité d'éthique de l'UNAPEI (Union nationale des associations de parents, de personnes handicapées mentales).

## ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU LABORATOIRE

Le groupe de recherche en génétique humaine rattaché à la chaire fait partie du département de médecine translationnelle et neurogénétique de l'IGBMC (Institut de génétique et biologie moléculaire et cellulaire, UMR 7104 du CNRS, Inserm U 964 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 développés avec le laboratoire de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg, dirigé par J.L. Mandel.

Liste des équipes et thématiques :

1) Mécanismes génétiques de maladies neurodéveloppementales responsables de déficiences intellectuelles (J.L. Mandel). a) Fonction de la protéine FMRP, déficiente dans le syndrome de retard mental avec X fragile (avec Hervé Moine, DR2 CNRS). b) Hétérogénéité génétique extrême du retard mental (avec ou sans autisme), applications diagnostiques et approches visant à expliquer le biais de sexe (avec Amélie Piton et Jean Muller, MCU-PH). c) Mécanismes du syndrome de Coffin-Lowry (retard mental syndromique lié au chromosome X) impliquant la protéine kinase Rsk2 (André Hanauer, MCU).

2) Mécanismes physiopathologiques de maladies neuromusculaires (Jocelyn Laporte, DR1 Inserm)

3) Mécanismes moléculaires de toxicité d'ARN avec expansions de répétitions tri- ou tétranucléotidiques (myotonies dystrophiques et syndrome FXTAS) (Nicolas Charlet-Berguerand, DR2 INSERM, lauréat en 2012 d'un *ERC starting grant* du Conseil européen de la recherche).

4) Mécanismes physiopathologiques et stratégies thérapeutiques de l'ataxie de Friedreich et d'autres ataxies récessives liées à des déficits mitochondriaux (Hélène Puccio, DR2 Inserm, lauréate d'un *ERC starting grant* du Conseil européen de la recherche).

5) Identification de nouveaux gènes impliqués dans des formes d'ataxies récessives, épidémiologie moléculaire et études de corrélation génotype/phénotype dans cette pathologie (Michel Koenig, PU-PH)

6) Mécanismes pathogéniques des maladies neurodégénératives causées par des expansions de polyglutamine, dont la maladie de Huntington et l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (Yvon Trottier, DR2 INSERM).

1a) *Syndrome de retard mental avec chromosome X fragile et fonction de la protéine FMRP*

Avec Hervé Moine, DR2 CNRS

Le syndrome X fragile représente la forme la plus fréquente de retard mental monogénique. Il résulte d'une expansion instable de répétitions CGG dans le gène *FMR1*, entraînant sa répression transcriptionnelle. *FMR1* code pour la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) qui lie des ARN messagers cibles au sein de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes. De nombreux travaux suggèrent un rôle de FMRP dans le métabolisme des ARNm neuronaux, notamment dans le transport dendritique et la traduction localisée d'ARNm importants pour la plasticité synaptique sous contrôle de la voie de signalisation des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1 et mGluR5). Cependant, le rôle précis de FMRP reste mal compris. Nous avons entrepris d'identifier des cibles ARNm de FMRP pouvant expliquer les phénotypes de la maladie et de caractériser l'action précise de FMRP sur ces cibles en utilisant un modèle murin du syndrome de l'X fragile. Nous avons montré antérieurement que FMRP se lie *in vitro* de manière spécifique et avec une forte affinité aux ARNm contenant un motif structural de type « G(uanine)-quadruplex » (Schaeffer *et al.*, 2001 ; Castet *et al.*, 2005) et contribue à la formation de granules d'ARN en condition de stress cellulaire (Didiot *et al.*, 2009). Nous avons identifié la présence d'un consensus G-quadruplex dans la région 3' non traduite d'une proportion importante des ARNm neuronaux localisés dans les dendrites et nous avons montré que le motif G-quadruplex représente un nouveau type de signal d'adressage des ARNm vers les dendrites (Subramanian *et al.*, 2011). Nous avons récemment montré, en collaboration avec l'équipe du Dr B. Bardoni (IPMC Sophia-Antipolis) que le motif G-quadruplex est également reconnu par la protéine paralogue FXR1, notamment l'isoforme musculaire qui contrôle l'expression de la protéine p21 en régulant la demi-vie de son ARNm *via* la reconnaissance d'un motif G-quadruplex dans la région 3'UTR de l'ARN. Ce mécanisme peut permettre d'expliquer certaines altérations de la myogenèse dans la dystrophie facio-scapulo-humérale (Davidovic *et al.*, 2013). Nous avons entrepris d'identifier l'ensemble des ARNm neuronaux les plus touchés par l'absence de FMRP en utilisant une approche CLIP (*cross linking immunoprecipitation*) sur des cultures de neurones du modèle murin de l'X fragile et de définir le mécanisme moléculaire par lequel FMRP contrôle l'expression de ses cibles.

#### Publications

Davidovic L., Durand N., Khalfallah O., Tabet R., Barbry P., Mari B., Sacconi S., Moine H., Bardoni B. (2013) A novel role for the RNA-binding protein FXR1P in myoblasts cell-cycle progression by modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA stability. *PLoS Genet*, 9: e1003367.

Millevoi S., Moine H., Vagner S. (2012) G-quadruplexes in RNA biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3: 495-507.

Sellier C., Freyermuth F., Tabet R., Tran T., He F., Ruffenach F., Alunni V., Moine H., Thibault C., Page A., Tassone F., Willemsen R., Disney M.D., Hagerman P.J., Todd P.K., Charlet-Berguerand N. (2013) Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep*, 3: 869-880.

*1b) Hétérogénéité génétique extrême du retard mental (avec ou sans autisme), applications diagnostiques et approches visant à expliquer le biais de sexe*

Avec Amélie Piton et Jean Muller, MCU-PH

Le retard mental (souvent associé à l'autisme) représente un problème majeur de santé publique, affectant 1 à 2 % de la population. Les causes génétiques (monogéniques, anomalies chromosomiques ou CNVs affectant un segment de chromosome) paraissent prédominantes, au moins pour les formes sévères, en plus de causes environnementales et probablement de causes dites « multifactorielles ». Les causes monogéniques apparaissent d'une hétérogénéité extrême, avec plus de 100 gènes identifiés sur le seul chromosome X dont les mutations sont responsables de déficience intellectuelle, et des études très récentes utilisant des stratégies de séquençage à haut débit de l'ensemble des gènes du génome humain (exome) suggèrent que plus de 500 gènes pourraient être impliqués dans des formes autosomiques dominantes (par mutations *de novo*). Plusieurs dizaines de nouveaux gènes impliqués dans des formes récessives ont été aussi identifiés. Mais le coût de ces approches, et la complexité de l'analyse de ces données massives ne permettent pas en l'état actuel de répondre aux besoins de diagnostic des patients et de leur famille, et il reste un travail considérable pour évaluer la contribution des mutations dans les gènes déjà connus, et les conséquences phénotypiques de ces mutations. Nous avons donc initié en 2012 le développement d'une stratégie de capture et séquençage des exons de 220 gènes (dont près de cent portés par le chromosome X), antérieurement identifiés dans des formes de déficience intellectuelle, avec ou sans autisme. Des résultats très prometteurs ont été obtenus pour les 107 premiers patients analysés, car nous avons identifié chez près de 25 % d'entre eux des mutations certainement causales. Cette approche nous a permis de valider certains gènes (*MAOA*, *NLGN3*, *MED13L*), dont l'implication n'était basée que sur l'observation de mutations dans une seule famille. En particulier, nous avons identifié un faux-sens pathogène dans le gène *MAOA* chez un patient et ses deux oncles avec autisme, troubles majeurs du comportement et déficience intellectuelle de sévérité variable. Ce faux-sens affecte sévèrement la fonction de l'enzyme MAOA. Il représente la première mutation décrite dans ce gène depuis la publication initiale portant sur une seule famille avec un phénotype similaire, en 1993 (Piton *et al.*, *Eur J Hum genet* 2013). L'analyse des données de ce projet nous a également permis de mettre en doute l'implication dans les troubles cognitifs des deux seules mutations faux-sens précédemment rapportées dans le gène *SRPX2* (Roll *et al.*, *Hum Mol Genet.* 2006). En plus du gène *SRXP2*, une analyse critique et systématique de la littérature et de la base de données de variants du génome « *Exome Variant Server* » nous a permis de remettre en cause l'implication d'une dizaine de gènes précédemment publiés comme étant impliqués dans la déficience intellectuelle liée au chromosome X (Piton, Redin *et al.*, *Amer J Human Genet* 2013). Cette stratégie a vocation à être transférée dans le cadre du laboratoire de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg en 2014, et a suscité un très grand intérêt de la part de nombreux généticiens cliniciens en France et à l'étranger.

Nous poursuivons également, dans le cadre d'un projet ANR, une approche visant à tester l'hypothèse d'un rôle des androgènes agissant en période prénatale et néonatale sur le fœtus masculin dans le biais de sexe observé dans le retard mental (1,4 garçons pour une fille) et surtout dans l'autisme (4 garçons pour une fille).

Nous explorons les gènes cibles dans des neuroblastes ou neurones humains, de la régulation transcriptionnelle par les androgènes et le récepteur aux androgènes (projet financé par l'ANR). Les cellules utilisées sont issues de la différenciation de cellules souches embryonnaires (collaboration avec le laboratoire du Pr Marc Pechanski, iSTEM Évry).

Nous avons continué les études génétiques sur le syndrome de Bardet-Biedl, à la fois poursuite de la stratégie de séquençage à haut-débit décrite dans le rapport de l'an dernier (Redin *et al.* 2012) et par collaboration du Dr Jean Muller (MCU-PH) avec l'équipe du Pr H. Dollfus, pour l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le syndrome de Bardet-Biedl ou d'autres pathologies génétiques développementales.

Publications complémentaires (J.L. Mandel pas co-auteur)

Fradin M., Merklen-Djafri C., Perrigouard C., Aral B., Muller J., Stoetzel C., Frouin E., Flori E., Doray B., Dollfus H., Lipsker D. (2013) Long-term follow-up and molecular characterization of a patient with a RECQL4 mutation spectrum disorder. *Dermatology*, 226(4):353-7 [doi: 10.1159/000351311].

Schaefer E., Lauer J., Durand M., Pelletier V., Obringer C., Claussmann A., Braun J.J., Redin C., Mathis C., Muller J., Schmidt-Mutter C., Flori E., Marion V., Stoetzel C., Dollfus H. Mesoaxial polydactyly is a major feature in Bardet-Biedl syndrome patients with LZTFL1 (BBS17) mutations. *Clin Genet*. 2013 May 21 [doi: 10.1111/cge.12198].

Scheidecker S., Etard C., Pierce N.W., Geoffroy V., Schaefer E., Muller J., Chennen K., Flori E., Pelletier V., Poch O., Marion V., Stoetzel C., Strähle U., Nachury M.V., Dollfus H. (2013) Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J Med Genet*. Sep 11 [doi: 10.1136/jmedgenet-2013-101785].

### 1c) Syndrome de Coffin-Lowry et kinase RSK2

André Hanauer, MCU

L'équipe étudie les mécanismes physiopathologiques pouvant être responsables des déficits cognitifs dans le syndrome de Coffin-Lowry. Les mutations-perte de fonction dans le gène RPS6KA3 lié au chromosome X, codant pour la protéine kinase RSK2, sont responsables de ce syndrome. Des souris invalidées pour le gène *Rsk2* ont été créées précédemment par l'équipe. Des souris invalidées pour le gène paralogue *Rsk3* créées par l'équipe d'André Hanauer ont permis très récemment de démontrer un rôle de ce gène dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques en réponse à un stress cardiaque chronique (Li *et al.*, 2012).

En 2010, une étude transcriptomique d'hippocampe de souris invalidées pour *RSK2* a révélé des altérations d'expression significatives de 100 gènes. Trois quarts de ces gènes montraient une expression augmentée chez les souris *Rsk2*-KO et le quart restant une expression diminuée. Nous avons étudié les mécanismes liés à certains de ces gènes pouvant être impliqués dans l'activité synaptique. Nous avons ainsi montré que le gène *Gria2* était surexprimé (environ deux fois) chez les souris *Rsk2*-KO. Ce gène code pour la sous-unité GluR2 du récepteur ionotrope AMPA, qui est impliqué dans la composante rapide du courant exciteur post-synaptique des neurones du système nerveux central. Des expériences d'enregistrement extracellulaire de la transmission synaptique AMPA avaient révélé une réduction d'environ 25 % de transmission AMPA chez les souris *Rsk2*-KO (Mehmood *et al.*, 2011). Plus récemment, nous avons montré que la LTP induite

par stimulation des collatérales de Schaeffer était également diminuée chez les souris *Rsk2*-KO (en préparation). Nous avons aussi montré qu'il existait une proportion plus élevée d'épines dendritiques matures dans des neurones hippocampiques en culture déficients en RSK2 que dans les neurones exprimant RSK2 (en préparation).

Nous avons abordé le mécanisme moléculaire impliqué dans l'augmentation d'expression de GluR2 dans les neurones déficients pour RSK2. Précédemment, nous avons montré que RSK2 exerçait un rôle physiologique inhibiteur sur sa propre voie dans les neurones, et qu'en conséquence le niveau de phosphorylation de ERK1/2 était significativement plus élevé dans les neurones d'hippocampe de souris *Rsk2*-KO que dans ceux de souris normales (WT), aussi bien à l'état basal qu'après stimulation au glutamate. Nous avons utilisé la technologie d'interférence ARN pour bloquer l'expression de RSK2 dans des cellules PC12. Nous avons ainsi montré que la surexpression de GluR2 dans les cellules n'exprimant pas RSK2 était causée par une activité accrue du facteur de transcription Sp1 sur la transcription du gène GluR2, conséquence de l'activité phosphorylante accrue de ERK1/2 sur Sp1 (Mehmood *et al.*, 2013).

#### Publications

Ammar M.R., Humeau Y., Hanauer A., Nieswandt B., Bader M.F., Vitale N. (2013) The Coffin-Lowry Syndrome-Associated Protein RSK2 Regulates Neurite Outgrowth through Phosphorylation of Phospholipase D1 (PLD1) and Synthesis of Phosphatidic Acid. *J Neurosci*. 2013 Dec 11, 33(50):19470-9 [doi: 10.1523/JNEUROSCI.2283-13.2013].

Li J., Kritzer M.D., Michel J.J., Le A., Thakur H., Gayanilo M., Passariello C.L., Negro A., Daniai J.B., Oskouei B., Sanders M., Hare J.M., Hanauer A., Dodge-Kafka K., Kapiloff M.S. (2013) Anchored p90 ribosomal S6 kinase 3 is required for cardiac myocyte hypertrophy. *Circ Res*, 112: 128-139.

Maystadt I., Destree A., Benoit V., Aeby A., Lederer D., Moortgat S., Jurkiewicz D., Krajewska-Walasek M., Hanauer A., Thomas G. (2014) RSK2 mutation co-segregates with X-linked intellectual disability and attenuated Coffin-Lowry phenotype in a three-generation family. *Clin Genet*, 85(1):96-9 [doi: 10.1111/cge.12122]. Epub 2013 Mar 17.

Mehmood T., Schneider A., Pannetier S., Hanauer A. (2013) Rsk2 Knockdown in PC12 Cells Results in Sp1 Dependent Increased Expression of the Gria2 Gene, Encoding the AMPA Receptor Subunit GluR2. *Int J Mol Sci*, 14: 3358-3375.

Morice E., Farley S., Poirier R., Dallerac G., Chagneau C., Pannetier S., Hanauer A., Davis S., Vaillend C., Laroche S. (2013) Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the *Rsk2* mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome. *Neurobiol Dis*, 58:156-68 [doi: 10.1016/j.nbd.2013.05.016].

Schneider A., Maas S.M., Hennekam R.C., Hanauer A. (2013) Identification of the first deep intronic mutation in the RPS6KA3 gene in a patient with a severe form of Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Med Genet*, 56: 150-152 [doi: 10.1016/j.ejmg.2012.11.007].

#### 2) Mécanismes physiopathologiques des maladies neuromusculaires : des bases moléculaires aux études précliniques dans les myopathies congénitales

Équipe dirigée par Jocelyn Laporte

Les myopathies congénitales sont des maladies génétiques rares très sévères et handicapantes. 40 % des patients n'ont pas de diagnostic moléculaire, empêchant un conseil génétique et une meilleure prise en charge. De plus, le défaut de compréhension

des mécanismes pathologiques et le manque d'animaux-modèles fidèles freinent le développement d'approches thérapeutiques. Les projets sont répartis en 3 axes : 1) identification de nouveaux gènes de myopathies congénitales et diagnostic génétique, 2) caractérisation des mécanismes cellulaires et physiopathologiques des protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires, 3) validation de modèles et approches précliniques pour les myopathies centronucléaires.

#### Identification de nouveaux gènes de myopathies congénitales et diagnostic génétique

Nous avons validé le séquençage et l'analyse d'exomes à partir de patients avec myopathies congénitales et identifié un nouveau gène de myopathie ainsi que plusieurs maladies alléliques. Nous avons identifié le premier gène muté dans les myopathies à agrégats tubulaires, le gène *STIM1* codant pour un senseur de calcium, et montré que les mutations dominantes conduisent à une activation constitutive de l'entrée de calcium dans les cellules (Bohm *et al.*, 2013a). Grâce à une approche similaire, nous montrons qu'une mutation de *RYR1* codant pour le récepteur à la ryanodine est à l'origine de la myopathie bénigne des Samaritains, et suggérons que cette population de consanguinité très ancienne, descendant des Israélites du royaume antique de Samarie au premier millénaire avant J.-C., est à risque de développer une hyperthermie maligne (Bohm *et al.*, 2012a). D'autre part, une approche gène-candidat a permis d'identifier la première mutation homozygote des GTPases de la classe dynamine dans un syndrome périnatal léthal (Koutsopoulos *et al.*, 2013) et une mutation affectant spécifiquement l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 (*BIN1*) dans une myopathie centronucléaire de phénotype très progressif (Bohm *et al.*, 2013b).

Des études comparatives ont permis de préciser les corrélations génotype-phénotype pour les myopathies centronucléaires dominantes (Bohm *et al.*, 2012b), la myopathie myotubulaire (Shichiji *et al.*, 2013 ; Biancalana, base de données interne), et la myopathie à détresse respiratoire précoce (Palmio *et al.*, 2013). Nous avons aussi développé et validé de nouvelles approches de diagnostic moléculaire pour la myopathie myotubulaire (Vasli *et al.*, 2012a ; Biancalana *et al.*, 2012), et plus généralement pour toutes les myopathies (Bohm *et al.*, 2013c) et toutes les maladies neuromusculaires (Vasli *et al.*, 2012b ; 2013) par séquençage haut débit. Ces applications sont en transfert au laboratoire de diagnostic (Pr J.L. Mandel) au CHU de Strasbourg.

#### Caractérisation des mécanismes cellulaires et physiopathologiques

Nous avons précisé les voies cellulaires régulées par les myotubularines (MTM) dont plusieurs membres sont mutés dans la myopathie myotubulaire (*MTM1*) ou la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (*MTMR2*, *MTMR13*). Des expériences sur des systèmes cellulaires et une souris *Mtm1* KO modèle de la myopathie myotubulaire ont permis de montrer que cette myopathie est associée à des défauts d'autophagie et de dégradation protéique (Al-Qusairi *et al.*, 2013), ce qui semble aussi le cas pour une myotubularine homologue *MTMR14* (Hnia *et al.*, 2012a). *MTM1* est plus précisément impliquée dans la régulation du niveau des phosphoinositides et du remodelage membranaire aux triades des fibres musculaires (Amoasii *et al.*, 2013). L'amphiphysine 2 (*BIN1*), mutée dans la myopathie centronucléaire récessive, est aussi impliquée dans le remodelage membranaire aux triades (Bohm *et al.*, 2013b). L'identification du rôle régulateur de *MTMR12* sur *MTM1* dans le muscle squelettique complète notre étude sur les spécificités des myotubularines dans un

muscle normal et pathologique (Gupta *et al.*, 2013). L'écriture de différentes revues a permis de synthétiser l'état des connaissances sur ces protéines et maladies associées (Amoasii *et al.* 2012a ; Hnia *et al.*, 2012b ; Cowling *et al.*, 2012 ; Romero et Laporte, 2013).

#### Modèles animaux et approches précliniques pour les myopathies centronucléaires

En plus de la création et la caractérisation de modèles poissons ou murins de différentes myopathies centronucléaires, nous avons identifié au niveau génétique 2 modèles canins pour la myopathie myotubulaire en 2010 et récemment pour la myopathie centronucléaire récessive (Bohm *et al.*, 2013b). Ces modèles sont inestimables pour des études précliniques. Nos études dans le modèle murin *Mtm1* KO ont caractérisé dans le détails l'amélioration phénotypique obtenue par injection d'un *Adeno-associated virus* (AAV) exprimant le gène *MTM1*, et ont précisé les phénotypes dépendants de l'activité enzymatique de *MTM1* sur les phosphoinositides de ceux indépendants (Amoasii *et al.*, 2012b). De façon inattendue, plusieurs symptômes de la myopathie myotubulaire dans ce modèle ne semblent pas liés à l'activité enzymatique. Ces différentes études pré-cliniques facilitent la mise en place d'essais cliniques sur cette myopathie.

#### Publications

Al-Qusairi L., Prokic I., Amoasii L., Kretz C., Messaddeq N., Mandel J.L., Laporte J. (2013) Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J.* 2013 May 21. [Epub ahead of print].

Amoasii L.\*, Bertazzi D.L.\*, Tronchère H., Hnia K., Chicanne G., Rinaldi B., Cowling B.S., Ferry A., Klaholz B., Payrastra B., Laporte J., Friant S. (2012) Phosphatase-dead Myotubularin Ameliorates X-linked Centronuclear Myopathy Phenotypes in mice. *PLoS Genet.* 2012 Oct, 8(10) : e1002965.

Amoasii L., Hnia K., Chicanne G., Brech A., Cowling B.S., Müller M.M., Schwab Y., Koebel P., Ferry A., Payrastra B., Laporte J. (2013) Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci.*, 126(Pt 8) :1806-19.

Böhm J., Chevessier F., Maues De Paula A., Koch C., Attarian S., Feger C., Hantaï D., Laforêt P., Ghorab K., Vallat J.M., Fardeau M., Figarella-Branger D., Pouget J., Romero N.B., Koch M., Ebel C., Levy N., Krahn M., Eymard B., Bartoli M., Laporte J. (2013) Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular aggregate myopathy. *Am J Hum Genet.* 92(2) : 271-8.

Böhm J., Leshinsky-Silver E., Vassilopoulos S., Le Gras S., Lerman-Sagie T., Ginzberg M., Lev D., Laporte J. (2012) Samaritan myopathy, an ultimately benign congenital myopathy, is caused by a RYR1 mutation. *Acta Neuropathol.*, 124(4) : 575-81. Cité dans Faculty 1000.

Böhm J., Vasli N., Maurer M., Cowling B., Shelton G.D., Kress W., Toussaint A., Prokic I., Schara U., Anderson T.J., Weis J., Tired L., Laporte J. (2013) Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly progressive Centronuclear Myopathy. *PLoS Genet.* 2013 Jun, 9(6) : e1003430.

Böhm J., Vasli N., Malfatti E., Le Gras S., Feger C., Jost B., Monnier N., Brocard J., Karasoy H., Gérard M., Walter M.C., Reilich P., Biancalana V., Kretz C., Messaddeq N., Marty I., Lunardi J., Romero N.B., Laporte J. (2013) An integrated diagnosis strategy for congenital myopathies. *PLoS ONE* 2013 Jun, 8(6) : e67527.

Gupta V.A., Hnia K., Smith L.L., Gundry S.R., McIntire J.E., Shimazu J., Bass J.R., Talbot E.A., Amoasii L., Goldman N.E., Laporte J., Beggs A.H. (2013) Loss of Catalytically

Inactive Lipid Phosphatase Myotubularin-Related Protein 12 Impairs Myotubularin Stability and Promotes Centronuclear Myopathy in Zebrafish. *PLoS Genet.* 2013 Jun, 9(6) : e1003583.

Koutsopoulos O.S., Kretz C., Weller C.M., Roux A., Mojzisova H., Böhm J., Koch C., Toussaint A., Heckel E., Stemkens D., Ter Horst S.A., Thibault C., Koch M., Mehdi S.Q., Bijlsma E.K., Mandel J.L., Vermot J., Laporte J. (2013) Dynamin 2 homozygous mutation in humans with a lethal congenital syndrome. *Eur J Hum Genet.*, 21 : 637-642.

Palmio J., Evilä A., Chapon F., Tasca G., Xiang F., Brådvik B., Eymard B., Echaniz-Laguna A., Laporte J., *et al.* (2013) Hereditary myopathy with early respiratory failure: occurrence in various populations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013 Apr 19.

Shichiji M., Biancalana V., Fardeau M., Hogrel J.Y., Osawa M., Laporte J., Romero N.B. (2013) Extensive morphological and immunohistochemical characterisation in myotubular myopathy. *Brain and Behavior* 2013 June 19. [Epub ahead of print].

Vasli N., Laporte J. (2013) Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol.* 2013 Jan, 125 : 173-185.

#### Chapitre de livre

Romero N.B., Laporte J. (2013) Chapitre 13 : Centronuclear myopathies. 2013:134-144. In Goebel HH, Sewry CA et Weller RO (éd.), *Muscle disease: Pathology and Genetics* (2<sup>e</sup> édition), Publisher, John Wiley & Sons Limited.

### 3) Étude des bases moléculaires de syndromes à ARN toxiques : dystrophies myotoniques et syndrome de tremblement et ataxie associé à l'X fragile

Nicolas Charlet-Berguerand, avec Chantal Sellier, ATER du Collège de France

Notre équipe étudie des maladies causées par l'accumulation d'ARN mutés qui séquestrent des protéines spécifiques. Nous nous intéressons plus particulièrement à deux maladies, les dystrophies myotoniques (DM) et le syndrome de tremblement et ataxie associé à l'X fragile (FXTAS).

a) Le syndrome FXTAS est une maladie neurodégénérative de survenue tardive qui touche les grands-parents (surtout masculins) d'enfants atteints du syndrome de retard mental avec X fragile. Cette maladie génétique est due à l'accumulation d'un ARN messenger du gène *FMRI* contenant entre 50 et 200 répétitions CGG (correspondant à la prémutation du gène, par rapport à la mutation complète cause du retard mental) qui séquestrent des protéines encore mal identifiées. Nous avons montré précédemment que les agrégats d'ARN contenant ces répétitions CGG séquestraient le facteur d'épissage SAM68 et les protéines DROSHA-DGCR8, conduisant ainsi à des altérations spécifiques de l'épissage et de la synthèse des micro-ARN chez les patients atteints de FXTAS (Sellier *et al.*, 2010 ; Sellier *et al.*, 2013). Nous poursuivons ces travaux pour clarifier les mécanismes moléculaires de FXTAS (collaboration avec Peter Todd, Ann Harbor, États-Unis) et pour établir de nouveaux modèles cellulaires de FXTAS, avec le développement de cellules iPS différenciées en neurones (en collaboration avec l'équipe de Cécile Martinat, I-stem, Paris) et, enfin, par la recherche de molécules pouvant atténuer l'effet toxique des répétitions CGG (collaboration avec Matthew Disney, Scripps Institute, États-Unis).

b) Les dystrophies myotoniques (DM) sont les formes adultes les plus communes de dystrophies musculaires. Elles sont causées soit par des expansions de répétitions des nucléotides CTG dans la partie 3'UTR du gène *DMPK* (dystrophie myotonique de type 1, DM1), soit par l'expansion de répétitions des nucléotides CCTG dans le premier intron du gène *ZNF9* (dystrophie myotonique de type 2, DM2). Ces



répétitions CTG ou CCTG sont transcrites et s'accumulent sous forme d'ARN mutés contenant ces longues répétitions. Il est clairement établi que ces ARN sont pathogéniques par un mécanisme de titration d'une protéine liant les ARN de type CUG et CCUG, la protéine Muscleblind (MBNL1). En effet, l'inactivation du gène *Mbnl1* chez la souris reproduit les symptômes des dystrophies myotoniques. MBNL1 est un facteur d'épissage et sa séquestration conduit à des altérations de l'épissage alternatif d'ARN pré-messagers spécifiques. Ainsi, l'altération de la régulation de l'épissage du canal chlore musculaire *CLCN1* conduit à une myotonie, expliquant ainsi l'un des symptômes cardinaux de ces maladies (Charlet *et al.*, 2002).

Un de nos objectifs principaux a été d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des autres symptômes observés chez les patients atteints de dystrophie myotonique. En collaboration avec l'équipe du Dr Jocelyn Laporte (IGBMC), nous avons mis en évidence une altération spécifique de l'épissage régulé par MBNL1 des transcrits *BIN1* chez les patients DM. Ceci altère la fonction normale de la protéine *BIN1*. Des souris reproduisant cette altération de l'épissage de *BIN1* développent une faiblesse musculaire évoquant celle observée chez les patients DM. Ce travail nous a ainsi permis d'identifier une cause probable de la faiblesse musculaire chez les patients DM (Fugier *et al.*, 2011).

Dans un deuxième temps, nous avons identifié une altération spécifique de l'épissage alternatif du canal sodium cardiaque (*SCN5A*). Il s'agit d'une cible prometteuse car des mutations de ce gène sont responsables du syndrome de Brugada, caractérisé par des arythmies cardiaques fatales. Il est à noter que l'incidence du syndrome de Brugada est 200 fois supérieure chez les patients DM que dans la population normale. Nos résultats montrent que l'épissage de *SCN5A* est régulé par le facteur MBNL1, expliquant ainsi l'altération de *SCN5A* chez les patients DM. Des mesures électrophysiologiques montrent que la forme d'épissage de *SCN5A* exprimée chez les patients atteints de DM présente une conductance altérée qui pourrait expliquer les troubles du rythme cardiaque caractéristiques de ces patients. Nous souhaitons confirmer ces résultats dans un modèle de souris transgénique exprimant la « forme DM » de *SCN5A*.

Enfin, nous avons identifié une nouvelle protéine, *rbFOX*, se liant spécifiquement aux répétitions CCUG (cause de DM2) et non aux répétitions ARN CUG (cause de DM1). Pour des raisons encore inexpliquées, les patients DM2 présentent un tableau clinique moins sévère que les patients DM1. Nos résultats montrent que *rbFOX* et MBNL1 sont en compétition pour lier les répétitions d'ARN CCUG ; la fixation de *rbFOX* conduisant donc à une moindre séquestration de MBNL1, cette compétition pourrait expliquer la moindre sévérité de la DM2 comparée à la DM1. Nous souhaitons valider cette hypothèse dans un modèle murin exprimant des répétitions CCUG.

#### Publications

Almeida S., Gascon E., Tran H., Chou H.J., Gendron T.F., Degroot S., Tapper A.R., Sellier C., Charlet-Berguerand N., Karydas A., Seeley W.W., Boxer A.L., Petrucelli L., Miller B.L., Gao F.B. (2013) Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol.*, 126(3) : 385-99 [doi: 10.1007/s00401-013-1149-y].

Disney M.D., Liu B., Yang W.Y., Sellier C., Tran T., Charlet-Berguerand N., Childs-Disney J.L. (2012) A small molecule that targets r(CGG)(exp) and improves defects in fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *ACS Chem Biol*, 7 : 1711-1718 [doi: 10.1021/cb300135h].

Sellier C., Freyermuth F., Tabet R., Tran T., He F., Ruffenach F., Alunni V., Moine H., Thibault C., Page A., Tassone F., Willemsen R., Disney M.D., Hagerman P.J., Todd P.K., Charlet-Berguerand N. (2013) Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep*, 3 : 869-880 [doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.004].

Todd P.K., Oh S.Y., Krans A., He F., Sellier C., Frazer M., Renoux A.J., Chen K.C., Scaglione K.M., Basrur V., Elenitoba-Johnson K., Vonsattel J.P., Louis E.D., Sutton M.A., Taylor J.P., Mills R.E., Charlet-Berguerand N., Paulson H.L. (2013) CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron*, 78 : 440-455 [doi: 10.1016/j.neuron.2013.03.026].

#### 4) Pathophysiologie des ataxies récessives liées à une dysfonction mitochondriale

Équipe dirigée par Hélène Puccio, DR2 Inserm

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques d'ataxies récessives liées à un déficit mitochondrial ainsi qu'à la fonction normale des protéines déficientes. Nous combinons des approches *in vivo* par la construction et l'étude de modèles murins et de modèles cellulaires, avec des approches biochimiques *in vitro*, pour développer à terme des approches thérapeutiques. Par l'étude de ces ataxies héréditaires, nous nous intéressons plus particulièrement à deux voies mitochondriales essentielles, la biogénèse des noyaux Fe-S et la biogénèse du Coenzyme Q10.

#### Le rôle de la frataxine dans l'assemblage de noyaux Fe-S

Les protéines à noyau fer-soufre (Fe-S) sont des composantes essentielles de la cellule, importantes pour la synthèse et la stabilité du génome nucléaire, la traduction des protéines, le métabolisme mitochondrial et la respiration cellulaire. Le processus de maturation des protéines Fe-S est une voie de biosynthèse fondamentale. Chez l'homme, des mutations dans plusieurs composants de cette machinerie sont associées à des troubles graves tels que des maladies neurodégénératives, myopathies ou anémie. Chez les eucaryotes, la première étape de la biosynthèse Fe-S se produit dans la mitochondrie, par un complexe multiprotéique, impliquant la formation de façon transitoire d'un noyau Fe-S sur une protéine dite d'échafaudage à partir de soufre inorganique et de fer ferreux. Le soufre est fourni par une activité enzymatique portée par une cystéine désulfurase. Des données expérimentales suggèrent que la frataxine et la ferrédoxine seraient respectivement impliquées comme source de fer et d'électrons, nécessaires dans le mécanisme de formation des centres Fe-S. Afin de disséquer le rôle de la frataxine, en collaboration avec le Dr Sandrine Ollagnier de Choudens (CEA-Grenoble), nous avons comparé les propriétés biochimiques et biophysiques du complexe d'assemblage, avec ou sans frataxine, en présence des deux substrats, le fer et la cystéine. Nous avons démontré que, dans la phase initiale de la biogénèse des centres Fe-S, la frataxine joue un rôle clé en contrôlant l'entrée de fer au sein de la « *scaffold* » via l'activation de la cystéine désulfurase, et qu'elle est essentielle pour assembler et protéger le noyau Fe-S dans celle-ci. Ces résultats fournissent des informations importantes sur le rôle de la frataxine pour la biosynthèse des noyaux Fe-S et ouvrent de nouvelles voies pour mieux élucider le mécanisme moléculaire de formation des noyaux Fe-S (Colin *et al.*, *J. Am Chem Soc.*, 2013).

### Développement d'une approche de thérapie génique pour l'ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich (AF), la plus fréquente des ataxies héréditaires, est caractérisée par une dégénérescence spinocérébelleuse et une cardiomyopathie hypertrophique. Elle est due à la diminution quantitative d'une protéine mitochondriale, la frataxine. Nous avons créé des modèles souris de l'AF par inactivation conditionnelle spatio-temporelle du gène de la frataxine qui reproduisent l'essentiel des caractéristiques physiopathologiques et biochimiques de la pathologie humaine. Nous avons développé une approche de thérapie génique en injectant un virus AAV (*Adeno-Associated Virus*) exprimant la frataxine dans le modèle murin développant la pathologie cardiaque. Nos résultats montrent que l'expression de la frataxine permet non seulement de prévenir le développement d'une cardiomyopathie hypertrophique, mais permet aussi de corriger le phénotype cardiaque et biochimique après injection post-symptomatique (Perdomini et Belbellaa, *soumis*). Nos résultats montrent pour la première fois un résultat thérapeutique efficace et prometteur pour le phénotype cardiaque FRDA dans un modèle de souris. Des études de dose-réponse dans le modèle cardiaque, ainsi que le potentiel d'une approche similaire sur un modèle neurologique, sont en cours d'évaluation.

### Modélisation de l'ataxie de Friedreich par le développement de cellules souches pluripotentes induites portant des expansions (GAA)<sub>n</sub> pathogéniques

Nous avons développé de nouveaux modèles cellulaires pour l'AF par l'approche des cellules souches pluripotentes induites (iPS). Cette stratégie est particulièrement intéressante dans le cas de l'AF car la mutation est une expansion de répétitions (GAA)<sub>n</sub> qui montre une forte instabilité génétique, très difficile à modéliser dans la souris. Les iPS ont été différenciées en neurones et en cardiomyocytes, les deux types cellulaires atteints dans l'AF. Les neurones et les cardiomyocytes dérivés des iPS AF développent des anomalies mitochondriales caractéristiques de l'AF. Par ailleurs, nous avons mis au point une méthode plus efficace pour obtenir des cardiomyocytes, avec une efficacité de 40 % (Hick *et al.*, 2013). Ces modèles seront des outils précieux pour étudier les conséquences du déficit en frataxine ainsi que les mécanismes de l'inactivation génique due à l'expansion (GAA)<sub>n</sub>. L'expansion (GAA)<sub>n</sub> dans les iPS montre une grande instabilité, nous permettant d'explorer les mécanismes impliqués.

### ARCA2 : une ataxie cérébelleuse liée à un déficit en coenzyme Q10

Une nouvelle forme d'ataxie récessive associée à un déficit en coenzyme Q10 (CoQ10), ARCA2 (*Autosomal recessive cerebellar ataxia type 2*) a récemment été identifiée par l'équipe de M. Koenig. Les patients présentent une ataxie cérébelleuse modérée débutant avant l'adolescence et une atrophie cérébelleuse. Par ailleurs, certains patients montrent une intolérance à l'exercice, des troubles cognitifs et la présence de crises épileptiques. Des mutations dans le gène codant pour ADCK3 sont à la base de cette maladie. ADCK3 est une kinase mitochondriale atypique probablement impliquée dans la régulation de la synthèse du coenzyme Q10, un lipide essentiel au transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Afin d'étudier le rôle de ce gène *in vivo* et de créer un modèle pour cette maladie, nous avons généré un modèle murin par recombinaison homologue. Ces souris développent une ataxie cérébelleuse progressive due à une dégénérescence spécifique des cellules de Purkinje du cervelet avec défaut ultrastructural de l'appareil de Golgi. Ces souris montrent des anomalies mitochondriales et un déficit en

coenzyme Q dans le muscle, et présentent une susceptibilité à l'épilepsie, un retard de mémoire spatiale ainsi que des signes de trouble du métabolisme lipidique. Les mécanismes physiopathologiques et les voies cellulaires impliquées dans les pathologies cérébelleuse et musculaire sont en cours d'analyse.

#### Publications

Colin F., Martelli A., Clemancey M., Latour J.M., Gambarelli S., Zeppieri L., Birck C., Page A., Puccio H., Ollagnier de Choudens S. (2013) Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J Am Chem Soc*, 135 : 733-740.

Hick A., Wattenhofer-Donze M., Chintawar S., Tropel P., Simard J.P., Vaucamps N., Gall D., Lambot L., Andre C., Reutenauer L., Rai M., Teletin M., Messaddeq N., Schiffmann S.N., Viville S., Pearson C.E., Pandolfo M., Puccio H. (2013) Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich's ataxia. *Dis Model Mech*, 6 : 608-621.

Laredj L.N., Licitra E., Puccio H. (2013) The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimie* [pii:S0300-9084(13)00443-4. doi: 10.1016/j.biochi.2013.12.006]. Review.

Martelli A., Napierala M., Puccio H. (2012b) Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech*, 5 : 165-176. Review.

Pastore A., Puccio H. (2013) Frataxin: a protein in search for a function *J Neurochem*, 126, Suppl 1 : 43-52 [doi: 10.1111/jnc.12220]. Review.

Perdomini M., Hick A., Puccio H., Pook M.A.(2013) Animal and cellular models of Friedreich ataxia. *J Neurochem*,126 Suppl 1 : 65-79 [doi: 10.1111/jnc.12219]. Review.

#### 5) Génétique moléculaire des ataxies récessives

Équipe M. Koenig

Nous avons initié la recherche de nouveaux gènes d'ataxie par séquençage des exomes (ensemble des séquences géniques codant pour des protéines présentes dans le génome humain) de patients issus de familles consanguines avec plusieurs enfants atteints. Nous avons identifié une variation faux-sens d'un acide aminé hautement conservé dans une famille avec ataxie et épilepsie que nous avons précédemment décrite (Gribaa *et al.*, *Brain*, 2007). La mutation touche le gène WWOX, contenant un domaine WW et un domaine oxydo-réductase, et connu pour être un suppresseur de tumeur. Cependant, une mutation spontanée du domaine oxydase a été rapportée chez les rats lde (*lethal dwarfism and epilepsy*). Ces rats présentent également dans 95 % des cas une ataxie, et ils représentent donc une forme très similaire de la maladie affectant nos patients, bien qu'elle soit plus sévère. En collaboration avec les Pr M. Aldaz (Texas) et L. Schöls (Tübingen, Allemagne), nous avons montré que la mutation altère fortement la fonctionnalité du domaine WW1 et qu'une deuxième famille (dont deux enfants présentent également un tableau précoce d'ataxie/épilepsie tonico-clonique et retard mental) porte une mutation faux-sens homozygote de la partie C-terminale du domaine oxydo-réductase. D'autre part, les souris avec inactivation conditionnelle du gène *Wwox* présentent un phénotype similaire mais plus sévère. Ceci confirme donc l'implication des mutations du gène WWOX dans ce tableau clinique présenté par ces deux familles (Mallaret *et al.*, *Brain*, 2013). Nous avons également participé à des travaux de caractérisation de corrélations

génotype-phénotype pour d'autres gènes impliqués dans des ataxies héréditaires (Mignot *et al.* 2013, Salih *et al.* 2013) et montré qu'une mutation que nous avons précédemment identifiée dans un nouveau gène associé à un phénotype d'ataxie (codant pour la protéine nommée « Rubicon ») altère la localisation endosomale de cette protéine (Assoum *et al.*, 2013). Ces travaux seront désormais poursuivis au CHU de Montpellier, suite à la mutation du Prof Michel Koenig, en septembre 2013.

#### Publications

Abu-Rashid M., Mahajnah M., Jaber L., Kornreich L., Bar-On E., Basel-Vanagaite L., Soffer D., Koenig M., Straussberg R. (2013). A novel mutation in the GAN gene causes an intermediate form of giant axonal neuropathy in an Arab-Israeli family. *Eur J Paediatr Neurol*, 17(3) : 259-264.

Assoum M., Salih M.A., Drouot N., Hnia K., Martelli A., Koenig M. (2013). The Salih Ataxia Mutation Impairs Rubicon Endosomal Localization. *Cerebellum* Dec, 12(6) : 835-40 [doi: 10.1007/s12311-013-0489-4].

Mallaret M., Synofzik M., Lee J., Sagum C.A., Mahajnah M., Sharkia R., Drouot N., Renaud M., Klein F.A., Anheim M., Tranchant C., Mignot C., Mandel J.L., Bedford M., Bauer P., Salih M.A., Schüle R., Schöls L., Aldaz C.M., Koenig M. (2013). The tumor suppressor gene *WWOX* is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation. *Brain* (sous presse). PMID: 24369382.

Mariani L.L., Degos B., Honnorat J., Trouillas P., Rabin M., Koenig M., Anheim M. (2013) From anti-GAD to ataxia with ocular motor apraxia type 2: through the looking glass. *J Neurol.*, 260(4) : 1158-9 [doi: 10.1007/s00415-013-6840-3].

Mignot C., Apartis E., Durr A., Marques Lourenço C., Charles P., Devos D., Moreau C., de Lonlay P., Drouot N., Burglen L., Kempf N., Nourisson E., Chantot-Bastaraud S., Lebre A.S., Rio M., Chaix Y., Bieth E., Roze E., Bonnet I., Canaple S., Rastel C., Brice A., Rötig A., Desguerre I., Tranchant C., Koenig M., Anheim M. (2013) Phenotypic variability in ARCA2 and identification of a core ataxic phenotype with slow progression. *Orphanet J Rare Dis.*, Oct 28, 8(1):173. [Epub ahead of print].

Salih M.A., Mundwiler E., Khan A.O., Aldrees A., Elmalik S.A., Hassan H.H., Al-Owain M., Alkhalidi H.M., Katona I., Kabiraj M.M., Chrast R., Kentab A.Y., Alzaidan H., Rodenburg R.J., Bosley T.M., Weis J., Koenig M., Stevanin G., Azzedine H. (2013) New findings in a global approach to dissect the whole phenotype of PLA2G6 gene mutations. *PLoS One*, 2013 Oct 9, 8(10) : e76831 [doi: 10.1371/journal.pone.0076831].

Wolf N.I., Koenig M. Progressive cerebellar atrophy: hereditary ataxias and disorders with spinocerebellar degeneration (2013). In Dulac O., Lasseigne M. and Sarnat H., (éd.) (2013) *Pediatric Neurology (Handbook of Clinical Neurology)*. Elsevier, Burlington, États-Unis, 113 : 1869-78 [doi: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00057-5].

#### 6) Maladies à expansion de polyglutamine

Yvon Trottier, avec F. Klein

L'équipe étudie la physiopathologie de la maladie de Huntington (MH) et de l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7). Ces deux maladies neurodégénératives à transmission dominante sont causées par des expansions de polyglutamine (polyQ), qui confèrent des propriétés toxiques aux protéines correspondant à chaque maladie. La toxicité des protéines mutées augmente avec la taille de la polyQ, et perturbe graduellement les mécanismes essentiels à la fonction et la survie des neurones, avec une spécificité d'atteinte neuronale qui diffère selon la maladie.

### Relations entre la structure, la taille et la toxicité des polyQ

Le modèle proposé pour expliquer la toxicité des polyQ suggère que l'expansion adopte une « conformation pathogénique » stable, qui promeut l'agrégation des protéines mutées et des interactions aberrantes avec des partenaires protéiques naturels. La confirmation de l'existence de cette conformation est un enjeu important, car cette conformation pourrait représenter une cible thérapeutique de choix.

Trois anticorps anti-polyQ – MW1, 1C2 et 3B5H10 – ont été largement utilisés pour sonder la conformation de polyQ. La structure cristalline de MW1 révèle un épitope non pathogène linéaire de la polyQ. En revanche, bien que la structure détaillée de son épitope soit inconnue, l'anticorps 3B5H10 est largement diffusé et utilisé comme un anticorps qui reconnaît la conformation toxique de la polyQ. Nous avons résolu la structure cristalline du domaine de liaison de l'antigène 1C2 (1C2-Fab) et effectué une comparaison directe entre les structures 1C2, MW1 et 3B5H10. Les anticorps MW1 et 1C2 ont des séquences et structures similaires, conformément à leur capacité à se lier à de courts polyQ et de voir leur avidité augmentée avec la taille de polyQ. De façon inattendue, l'anticorps 3B5H10 partage également les caractéristiques principales de MW1 et 1C2, ce qui nous a incités à revoir ses propriétés d'interaction. Nous montrons que l'épitope 3B5H10 est en fait une court polyQ non-pathogène. Tous les trois anticorps MW1, 1C2 et 3B5H10, interagissent avec des polyQ de différentes longueurs, incluant les petites polyQ, dans des conformations linéaires et allongées similaires.

En accord avec nos travaux précédents et d'autres études récentes, ces nouvelles données plaident contre l'hypothèse d'une conformation mutante spécifique. Un modèle dépendant du contexte (protéique, cellulaire, âge, etc.) constituerait un modèle de toxicité plus plausible. Dans ce modèle, n'importe quelle polyQ variant entre Q20 et Q60, dans un contexte protéique et cellulaire donné, est susceptible d'être toxique avec le temps en submergeant la machinerie de contrôle de l'homéostasie des protéines. Cela se traduirait par l'accumulation de fragments de protéines mal repliées et avec des propriétés toxiques conduisant à la maladie. (Klein *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2013).

### Criblage à haut débit de modulateurs d'agrégation

Avec l'aide financière de la FRM, l'AFM et la SATT Conectus, nous avons récemment développé une technologie, *SynAggreg*, qui permet de cribler à haut débit de façon automatisée des modulateurs d'agrégation de polyQ. Nous avons effectué un premier criblage de la banque de molécules de la société Prestwick et 40 molécules candidates sont testées en dose-réponse. Outre le criblage de molécules, notre but est d'utiliser *SynAggreg* afin d'étudier des combinaisons de modulateurs d'agrégation pour identifier celles qui agissent de façon synergique pour prévenir la formation d'agrégats toxiques ou stimuler la formation d'agrégats non-toxiques. Ceci pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique pour la MH. *SynAggreg* pourrait aussi représenter un outil pour tester des combinaisons de molécules préalablement identifiées contre les amyloïdes impliqués dans d'autres protéinopathies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Afin de valoriser *SynAggreg*, nous avons obtenu un soutien d'un fond d'investissement associé à l'université de Strasbourg, et avons établi un partenariat avec une compagnie de biotechnologie suisse.

### Une nouvelle fonction de la huntingtine dans le cil et pathologie ciliaire dans un modèle souris de la maladie

Nous avons montré pour la première fois une nouvelle fonction de la huntingtine (Htt) dans le cil. Htt se localise dans divers types de cils – dont le cil non motile sensoriel des neurones et les cils motiles multiples de la trachée et des cellules épendymaires. Dans le cil du photorécepteur, la Htt est présente dans les compartiments sous-ciliaires de la base du cil et le centriole adjacent à la pointe de l'axonème. Chez les souris modèles de maladie de Huntington, la Htt mutante entraîne une perte de la Htt sauvage dans le cil des photorécepteurs, associée à un allongement aberrant des cils, une hyperacétylation de l'alpha-tubuline, une anomalie du transport intraflagellaire menant au transport inefficace de la rhodopsine et de l'arrestine-1 dans les segments externes des photorécepteurs, et enfin à la perturbation de l'intégrité du segment externe. Tout cela contribue à la dégénérescence des photorécepteurs, mettant la MH sur la liste croissante des ciliopathies. La pathologie ciliaire pourrait ainsi contribuer à la physiopathologie de la MH et représenter une nouvelle cible thérapeutique.

#### Publications

Goula A.V., Stys A., Chan J.P., Trottier Y., Festenstein R., Merienne K. (2012) Transcription elongation and tissue-specific somatic CAG instability. *PLoS Genet*, 8 : e1003051.

Klein F.A., Zeder-Lutz G., Cousido-Siah A., Mitschler A., Katz A., Eberling P., Mandel J.L., Podjarny A., Trottier Y. (2013) Linear and extended: a common polyglutamine conformation recognized by the three antibodies MW1, 1C2 and 3B5H10. *Hum Mol Genet*, Oct 15, 22(20) : 4215-23 [doi: 10.1093/hmg/ddt273].

#### PARTICIPATION À DES PROJETS EUROPÉENS

L'équipe d'Hélène Puccio fait partie du consortium européen EFACTS (European Friedreich Ataxia Consortium for Translational Studies) financé par le 7<sup>e</sup> programme cadre (FP7) de la Commission européenne (2010-2014). Les projets d'Hélène Puccio sont par ailleurs financés par un *ERC starting grant* obtenu en 2007. Dans le cadre des programmes européens *ERA-Net for Research Programmes on Rare Diseases*, Michel Koenig est coordonnateur du projet Euro SCAR « Nosology and molecular diagnosis of the degenerative recessive ataxias » et Jocelyn Laporte participe avec deux autres équipes au projet MTMPathies2 « MTM1 and MTMR2 myotubularins : biochemical activity and the regulation of membrane trafficking in health and disease » ainsi qu'au consortium européen « SARCOSI : Sarcomeric Signals in muscle remodelling » (*training network FP7-PEOPLE*). Nicolas Charlet est lauréat de l'*ERC Starting grant 2012*, pour son projet sur les maladies à gain de fonction d'ARN. J.L. Mandel participe au projet FP7 Gencodys (*Genetic and epigenetic networks in cognitive dysfunction*, 2010-2015), qui réunit 11 partenaires européens.