

## Génétique humaine

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

COURS : GÉNÉTIQUE DES MALADIES COMMUNES ET MÉDECINE PRÉDICTIVE  
OU PERSONNALISÉE : ACTUALITÉS ET PERSPECTIVES  
(EN HOMMAGE À JEAN DAUSSET)

Une série de 6 cours en hommage au professeur Jean Dausset a été donnée les 10, 17 et 23 mars 2010 au Collège de France, sur le thème : « Génétique des maladies communes et médecine prédictive ou personnalisée : actualités et perspectives ». Ces cours ont été filmés et sont accessibles sur le site Internet du Collège de France.

Dès 1972, Jean Dausset évoquait l'intérêt prédictif potentiel d'associations entre déterminants HLA et maladies, et dans son livre *Clin d'œil à la vie* (Éditions Odile Jacob, 1998), il prévoyait et appelait de ses vœux la médecine prédictive « qui devrait changer la nature de la consultation médicale du XXI<sup>e</sup> siècle », en mettant l'accent sur des approches de prévention individualisée des pathologies. À l'heure de l'explosion des analyses génétiques des maladies communes par la stratégie de « Genome Wide Association Studies (GWAS) », de l'émergence du séquençage génomique à très haut débit, et du développement d'applications plus ou moins validées du génotypage de facteurs de risque, dans un cadre médical ou même commercial d'offre directe aux consommateurs (« *direct to consumer genetic diagnostic tests* »), il est important d'examiner ce qu'apportent ces approches pour la connaissance des mécanismes de maladies, et quelles applications sont envisageables à court terme dans le cadre actuellement médiatisé de la médecine prédictive ou personnalisée.

En introduction à ce cours a été évoquée une facette moins connue de Jean Dausset, son intérêt pour l'art pictural et les artistes de son temps, qui l'avait conduit à fonder, avec M<sup>me</sup> Nina Dausset, la librairie puis Galerie du Dragon/Galerie Nina Dausset, qui exposa de 1948 à 1954 des œuvres de Pierre Alechinsky, Sam Francis, André Masson, Jean-Paul Riopelle, Yves Tanguy, Wolfgang Wols etc. Plusieurs de ces

artistes étaient représentés dans la collection personnelle de Jean Dausset (catalogue de vente binoche, 8 juillet 1999). Jean Dausset fit à cette époque la connaissance de l'artiste Wols, qu'il assista comme médecin dans sa dernière année de vie, et dont il a évoqué le souvenir dans un texte émouvant. L'investissement intense de Jean Dausset dans la recherche médicale, mais aussi dans la conception d'une réforme majeure du système hospitalo-universitaire français, mit un terme à cette activité annexe, qui eut de manière très surprenante, 30 ans après, une répercussion décisive pour les activités scientifiques de Jean Dausset. En effet, à la suite de l'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine, en 1980, une collectionneuse, M<sup>me</sup> Hélène Anavi, rencontrée à l'époque de la galerie Nina Dausset, décida de léguer au bénéfice des recherches de Jean Dausset son extraordinaire collection de tableaux, avec des œuvres majeures de peintres surréalistes (Max Ernst, Victor Brauner, Miro, Yves Tanguy), de Balthus et de Jean Dubuffet. Cette collection fut vendue en mars 1984 chez Sotheby's à Londres (catalogue préfacé par Jean Dausset) et le produit permit la même année la création du Centre d'étude du Polymorphisme humain (CEPH, qui deviendra plus tard la Fondation Jean Dausset/CEPH). Le CEPH a joué un rôle capital (poursuivi de 1991 à 1995 au laboratoire Généthon), avec Daniel Cohen, Mark Lathrop et Jean Weissenbach, dans le développement des cartes génétiques et physiques du génome humain, premières étapes dans le projet de séquençage du génome humain, et dans l'identification, grâce à ces outils, de gènes impliqués dans des maladies (les premiers gènes de diabète MODY ou de myopathie des ceintures, plus tard le premier gène de prédisposition à la maladie de Crohn, furent identifiés au CEPH, qui contribua également à l'identification des gènes d'amyotrophie spinale, de polyposé colique, du syndrome de retard mental avec X fragile, etc.). Le CEPH/Fondation Jean Dausset reste un acteur majeur des recherches sur la génétique des maladies communes (cancers, asthme..., cf. compte-rendu ci-dessous des journées d'hommage à Jean Dausset).

Après un rappel des notions de déséquilibre de liaison et d'haplotypes qui sous-tendent les stratégies d'études d'association utilisées pour l'identification des facteurs génétiques de risque dans les maladies communes, le 2<sup>e</sup> cours fut consacré à revisiter certaines des associations classiques HLA-maladies, à la lumière des travaux récents concernant la narcolepsie (cf. résumé ci-dessous de la conférence du prof. E. Mignot sur ce sujet), la spondylarthrite ankylosante et la maladie coeliaque. Dans le cas de la spondylarthrite ankylosante, si le mécanisme précis de l'effet majeur de HLAB27 n'a pas été élucidé, les travaux récents (GWAS) ont mis en lumière un rôle des voies impliquant les interleukines IL23 et IL1, et ouvrent la voie à des perspectives thérapeutiques (cf. Thomas and Brown, *Immun. Review*, 2010). La maladie coeliaque (intolérance au gluten) représente un système génétique plus complexe impliquant HLA, car le facteur de risque dépend des variants alléliques (en cis ou trans) de deux gènes, DQA1 et DQB1 codant pour un hétérodimère. Même si l'effet des allèles à risque est important (mesuré par l'*Odds Ratio* ou OR), ils sont très loin d'être prédictifs : les porteurs d'allèles DQA05 et DQB02 qui représentent 25 % de la population, ont un risque de 1 % de développer la maladie, risque qui est de 0,04 % pour le reste de la population

(travaux de F. Clerget-Darpoux). Des études de liaison ou d'association ont mis en évidence un rôle de régions chromosomiques (5q31, 2p33) contenant des gènes de régulation immunitaire, ainsi que des interleukines IL2 et IL21 et d'autres gènes impliqués dans le contrôle des réponses immunitaires, avec des effets modestes sur le risque (cf. Hunt *et al.*, *Nature Genet.*, 2008.).

L'explosion (épidémie) des études GWAS fut présentée en introduction au 3<sup>e</sup> cours. La première fut publiée en 2005, et c'est à partir de mi-2007 que le rythme s'est accéléré, avec les travaux du Wellcome Trust Consortium portant sur 7 pathologies (*Nature*, 2007), et ceux de la compagnie Decode en Islande. Fin 2009, plus de 658 signaux d'association (entre un locus et une maladie) atteignant une significativité statistique « genome wide » de  $p < 5 \cdot 10^{-8}$  avaient été publiés. Ces études sont basées sur l'hypothèse de l'implication de polymorphismes fréquents (> 5 %) comme facteurs de risque dans les maladies communes, mais conférant un risque modéré à faible (OR très rarement supérieur à 2, et le plus souvent inférieur à 1,5). Les études GWAS ne permettent pas, pour des raisons de taille de cohorte et de technologie de génotypage, de tester l'effet des variants rares, à l'exception des variations de nombre de copie de segments de plusieurs centaines de kilobases (CNVs). Le cours fut consacré à deux pathologies pour lesquels des variants fréquents et à effet particulièrement fort ont été détectés. Pour la dégénérescence maculaire liée à l'âge, responsable de perte progressive de vision, les études à partir de 2005 ont montré l'implication de polymorphismes dans le gène du facteur H de la cascade du complément, et d'un gène de fonction complètement inconnue à l'époque (LOC387715/ARMS2), et non conservé dans l'évolution (il n'est présent que chez les primates, ce qui ne permet pas les études fonctionnelles chez la souris). Les polymorphismes de ces gènes ont un effet fort (OR de 2 à 3 par allèle à risque) et additif. L'identification de polymorphismes à effet plus faible dans d'autres gènes de la cascade du complément ont confirmé son importance pour cette pathologie fréquente, et une probable fonction mitochondriale pour ARMS2 suggère l'implication des ROS (*reactive oxygen species*). Les combinaisons de ces polymorphismes et d'un facteur environnemental (cigarette) permettent de définir des classes de risque (Zanke *et al.*, *Canad. J. Ophthalmology*, 2010) dont l'utilité ne pourra être affirmée que si elle permet des actions préventives ou thérapeutiques (en tenant compte que la majorité des cas de DMLA surviennent chez des personnes à risque modéré ou faible, les catégories à haut risque étant minoritaires). Le 2<sup>e</sup> exemple présenté fut celui de la maladie d'Alzheimer (MA). Après la découverte inattendue en 1993 d'un polymorphisme fréquent du gène ApoE (codant pour un transporteur de cholestérol) comme facteur génétique majeur de risque, et l'identification de mutations très rares dans les gènes APP et PS1 et 2 (présénilines) dans des familles avec formes précoces et d'hérédité dominante de MA, confortant le rôle prépondérant du peptide  $\beta$  amyloïde dans la MA, il fallut attendre 2009 pour que des études GWAS permettent d'identifier d'autres gènes avec des effets détectés plus faibles (les nombreuses études antérieures d'association avec plus de 500 gènes candidats n'ayant pas apporté de résultats reproductibles...), confortant le rôle des lipides, et du métabolisme du peptide  $\beta$

amyloïde, et suggérant l'implication des voies d'endocytose (Sleegers *et al.*, *Trends in Genetics*, 2010). Mais il n'existe à l'heure actuelle pas d'indication réelle d'utilité de test de génotypage prédictif (hors de protocoles d'essais cliniques), et les nombreux travaux sur l'implication majeure d'ApoE dans la MA n'ont pas encore abouti à une application thérapeutique.

Le 4<sup>e</sup> cours fut consacré à des applications dans le domaine des maladies cardiaques, contrastant les études GWAS et les analyses de variants rares. Des études GWAS concordantes ont identifié un locus de risque en 9p21, qui pourrait correspondre à un long ARN non codant, mais le génotypage de ce locus ne présente pas d'utilité clinique validée (Palomaki *et al.*, *JAMA*, 2010 ; Holdt *et al.*, *Arterioscleros. Thromb. Vasc. Biol.*, 2010). En contraste avec ces études de polymorphismes fréquents, l'équipe de Jonathan Cohen et Helen Hobbs à Dallas a publié d'importants travaux montrant l'importance de variants rares testés par reséquençage de gènes candidats dans des cohortes aux extrémités de distribution des taux d'HDL cholestérol ou de triglycérides (Cohen *et al.*, *Science*, 2004 ; Romeo *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2009) ou en rapport avec le risque de maladie coronarienne. Une illustration particulièrement intéressante de cette stratégie est fournie par l'analyse du gène PCSK9 codant pour une protéase impliquée dans le métabolisme du LDL cholestérol. Ce gène avait été initialement identifié par l'équipe de C. Boileau comme muté (mutation faux sens) dans une grande famille avec hypercholestérolémie dominante familiale (Abifadel *et al.*, *Nat. Genet.*, 2003). J. Cohen *et al.*, (*NEJM*, 2006) ont par la suite mis en évidence des mutations de type perte de fonction (nonsense) à l'état hétérozygote chez 2,6 % de sujets afro-américains, entraînant une réduction de 28 % du LDL cholestérol et surtout une diminution de 88 % du risque de maladie coronarienne. Des variants hypomorphes présents à une fréquence similaire dans la population caucasienne entraînent une diminution du risque de maladie coronarienne de 47 %. De tels résultats indiquent évidemment que PCSK9 est une cible thérapeutique idéale pour cette pathologie, mais montrent aussi les difficultés d'interprétation d'une variation dans un gène, avec des effets opposés selon que le changement entraîne une perte ou un gain de fonction, difficultés d'interprétation qui sont démultipliées quand on passe au séquençage systématique des gènes d'un individu.

Au cours du 5<sup>e</sup> cours, j'ai évoqué le cas de l'autisme et de la schizophrénie, où les études GWAS se sont révélées très décevantes, suggérant une implication très faible de polymorphismes fréquents sur le risque d'en être atteint, alors que les études de jumeaux indiquent une contribution génétique importante pour ces pathologies. L'analyse de variants très rares de type CNV (*Copy Number Variants*) a apporté au contraire des informations capitales, mêmes si elles ne concernent pour le moment que quelques pourcents de patients. En effet, depuis les premières publications de Sebat *et al.*, *Science*, 2007 ; Marshall *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* ; Morrow *et al.*, *Science*, 2008, de très nombreuses publications ont montré la présence chez 5-10 % de patients avec autisme, et avec une fréquence un peu moins élevée pour la schizophrénie, de variants rares absents (ou tout au moins présents avec une fréquence beaucoup plus faibles) dans les populations contrôles, et survenant souvent comme mutation *de novo* (c'est-à-dire non présente chez les parents). Ces

CNVs sont très hétérogènes, contiennent le plus souvent des gènes impliqués dans les fonctions ou la plasticité des synapses, et suggèrent que ces pathologies psychiatriques relativement communes pourraient être, au moins en partie, une somme de maladies rares monogéniques ou paucigéniques (des intéressantes données en faveur de mécanismes de type « *double hit* » ont été récemment publiées par l'équipe de E. Eichler, Girirajan *et al.*, *Nature Genet.*, 2010). De manière totalement inattendue, certaines de ces mutations ont été retrouvées à des fréquences cumulatives similaires dans des cohortes de patients avec retard mental, avec autisme, et même de patients avec schizophrénie (cf. l'important travail de l'équipe de Dominique Campion à Rouen, Guilmatre *et al.*, *Arch. Gen. Psychiatry*, 2009), ce qui va obliger à reconsidérer la spécificité de ces catégories diagnostiques.

Pour les pathologies telles que le diabète de type 2 ou la maladie de Crohn, les analyses GWAS ont permis d'identifier de manière solide un nombre assez important d'allèles à risque dans des gènes différents (mais qui ont en général un effet faible sur le risque, mesuré par l'*Odds Ratio*). Toutefois, ces facteurs génétiques de risque n'expliquent le plus souvent qu'une part relativement mineure de la récurrence familiale de ces maladies représentée par la valeur estimée du coefficient d'héritabilité. Ceci a généré depuis 2008 de vives discussions dans la littérature, sur l'explication, ou même la réalité, de cette « *missing heritability* » (cf. Manolio *et al.*, *Nature*, 2009) : implications de variants rares non détectés dans les études GWAS, surestimation de l'héritabilité, sous-estimation des facteurs environnementaux ou des interactions gènes environnement ?... Des études récentes ont montré que cette structure du risque génétique ne permet pas en général d'utiliser de manière efficace les données actuelles pour une prédiction médicalement utile (ou n'apportent guère plus d'informations sur le risque que les données biocliniques classiques), à l'éventuelle exception d'une très petite minorité d'individus à risque cumulatif particulièrement élevé (cf. travaux sur le diabète de type 2, Sladek *et al.*, 2007, dont la présentation médiatique sur l'aspect prédictif contredisait complètement les conclusions, et Meigs *et al.*, *NEJM*, 2008 ; sur la maladie de Crohn, Weersma *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 2009 ; sur le cancer du sein (hors mutations rares très pénétrantes des gènes BRCA1 et BRCA2), Easton *et al.*, *Nature*, 2007 ; Wacholder *et al.*, *NEJM*, 2010 ; cancer de la prostate, Thomas *et al.*, *Nat. Genet.*, 2008). En fait, les premières applications utiles en médecine prédictive ou personnalisée des travaux récents se situent plutôt dans le domaine de la pharmacogénétique. Des réactions potentiellement mortelles d'hypersensibilité à l'abacavir (un anti-HIV) sont pratiquement limitées aux personnes porteuses d'un allèle HLA particulier, HLA B\*5701, et plusieurs pays (et l'Agence de biomédecine en France) recommandent d'exclure la présence de cet allèle avant d'entreprendre un traitement à l'abacavir (Mallal *et al.*, *NEJM*, 2008). Des études très récentes ont également montré l'utilité clinique de tester deux marqueurs génétiques qui permettent d'assez bien prédire l'efficacité, et donc les dosages adaptés, pour un anticoagulant majeur, la warfarine (Intern. Warfarin Pharmacogenetics Consortium, *NEJM*, 2009). Un polymorphisme dans le gène SLCO1B1 paraît intéressant pour le risque (faible) de myopathie consécutive à des traitements par les statines.

Le 6<sup>e</sup> cours s'est terminé par une discussion sur les offres très controversées de test génétiques couvrant l'ensemble du génome, à des fins de prédiction de risque de maladies communes, de tests à orientation pharmacogénétique, mais aussi de prédictions de traits non pathologiques ou à visée généalogique, proposés directement au public sans l'intervention de médecins (*Direct to Consumer Tests*, ou DTC), par des compagnies telles que Decode (Islande) ou 23andMe (États-Unis, compagnie associée à Google). Si certaines compagnies proposaient des tests génétiques sans garantie scientifique, pouvant être assimilés, selon le mot de J.C. Kaplan, à de la génomancie, les tests proposés par Decode ou 23andMe correspondent à un état de l'art technologique, avec des compétences scientifiques indiscutables, et, comme ce fut présenté pour 23andMe, une qualité certaine des informations disponibles sur le site internet. Bien évidemment, les limitations évoquées plus haut ne permettent qu'exceptionnellement une prédiction médicalement utile, donc on peut considérer qu'ils sont actuellement largement inutiles au plan médical (hors peut être certains marqueurs pharmacogénétiques, ou la détection de mutations responsables de maladies monogéniques), et sont du domaine de la « génomique récréationnelle » (selon le mot de G.J. Van Ommen, *Eur. J. Hum. Genet.*, 2008). Mais sont-ils dangereux ?, et même si la qualité technologique est garantie, faut-il les interdire (ce qui est le cas dans certains états des États-Unis), ou ont-ils une valeur éducative pour ceux qui y ont recours ? L'avis plus que réservé de la Fédération française de génétique humaine sur les tests génétiques DTC a été présenté, mais au-delà des réactions basées sur des principes, il serait bon d'étudier de manière scientifique les dangers ou avantages potentiels des tests DTC, notamment dans le domaine du dépistage de mutations associées à des maladies monogéniques sévères (tests proposés par Counsyl, aux États-Unis). Enfin, l'extraordinaire révolution technologique qui a fait s'effondrer les prix du séquençage complet du génome humain (20 000\$ début 2010, contre 3 milliards pour le séquençage d'un premier génome humain) pose la question de l'utilité d'un tel séquençage en médecine prédictive ou personnalisée. L'article de Lupski *et al.* (*NEJM*, 2010) illustre bien, hors l'identification des mutations responsables d'une maladie monogénique, l'impossibilité actuelle d'analyser la signification, en terme de santé, des milliers de variants affectant la séquence de protéines (variants faux sens) retrouvés chez un individu. Comme le remarquait un éditeur, la connaissance de la séquence complète du génome de Jim Watson, et celle de dizaines de gènes dont des polymorphismes ont été associés à la variation de taille chez l'homme, ne permet pas de prédire la taille de Jim Watson, alors que l'on sait depuis le début des années 1900, qu'un bon prédicteur de la taille d'une personne est la taille de ses parents !

#### JOURNÉES JEAN DAUSSET

J'ai participé, avec les professeurs Pierre Corvol, Philippe Kourilsky et Laurent Degos à l'organisation des Journées Jean Dausset, qui ont rendu hommage à l'œuvre de ce très grand chercheur et médecin, prix Nobel de médecine et

physiologie (1980) et professeur au Collège de France de 1977 à 1987. Ces journées se sont déroulées les 8 et 9 janvier 2010 à l'amphithéâtre Marguerite de Navarre. Les conférenciers, dont plusieurs avaient été élèves de Jean Dausset ou l'avaient côtoyé, ont présenté dans une première partie des questions actuelles en immunologie et en biologie de la transplantation, domaines pour lesquels la découverte du système HLA a eu un impact majeur. Une série de conférences fut ensuite consacrée à l'explosion des recherches basées sur l'analyse du polymorphisme du génome humain, dans lesquelles le CEPH-Fondation Jean Dausset joua un rôle initiateur majeur, notamment dans les domaines de la génétique des populations humaines et des facteurs génétiques de prédisposition aux maladies communes, auxquels Jean Dausset s'était particulièrement intéressé.

La session « Génétique et diversité du génome humain » fut présidée par Howard Cann (CEPH-Fondation Jean Dausset, Paris). Jean Weissenbach (Centre national de séquençage, Évry) retraça la création du CEPH en 1984, dans la ligne des collaborations internationales instaurées par Jean Dausset dans les « Workshops HLA », et de son rapport privilégié avec les familles de donneurs de sang qui avaient apporté leur concours pour ses recherches sur le système HLA. Le CEPH permit le développement rapide de la cartographie génétique du génome humain par une initiative audacieuse, la distribution, à tous les laboratoires internationaux intéressés, de l'ADN des fameuses grandes « familles du CEPH ». Sous l'impulsion de Jean Dausset, Daniel Cohen et Jean Weissenbach, le CEPH joua un rôle décisif dans les premières étapes de cartographie physique (bibliothèques de chromosomes artificiels de levure, ou YAC) et génétique (marqueurs microsatellites) du projet international de séquençage du génome humain. Ces approches furent amplifiées en coopération avec l'Association française contre les myopathies (sous l'impulsion de Bernard Barataud) dans le cadre du Généthon. Le CEPH et le Généthon instaurèrent dans ce grand projet international une philosophie et pratique du partage des données et d'outils communs. Howard Cann présenta le rôle du CEPH dans le « Human Genome Diversity Project » (HGDP), initié par L. Cavalli-Sforza et Jean Dausset, pour l'analyse génétique des populations humaines, permettant de retracer leur évolution au travers des migrations historiques mais aussi des effets de sélection darwinienne.

Mark Lathrop (Centre national de génotypage, Évry, et directeur scientifique du CEPH-Fondation Jean Dausset) présenta les travaux récents du CEPH dans le domaine des prédispositions génétiques à divers cancers (poumon, mélanome, gliome), dans le cadre de grands projets nationaux (INCA), européens et internationaux, et des facteurs de prédisposition à des maladies communes telles que l'asthme (avec F. Demenais, INSERM et CEPH). Une illustration frappante a été la découverte très récente de l'implication de gènes codant pour des sous-unités du récepteur acétylcholine nicotinique dans le risque de développer un cancer du poumon, risque qui ne paraît expliqué que partiellement par un effet sur la consommation de cigarettes, et qui suggère une implication directe de ce récepteur et de la nicotine dans les mécanismes de ce cancer. Les deux autres régions génomiques reconnues par ces études de « Genome Wide Association ou GWAS » dans le cancer du poumon sont le gène TERT (télomérase reverse

transcriptase, également impliqué dans des fibroses pulmonaires) et, de manière intéressante et encore inexpliquée, le locus HLA, ajoutant ainsi une nouvelle pathologie à la longue liste des implications HLA-maladies.

Luis Quintana-Murci (Institut Pasteur, Paris) présenta, dans la droite ligne des intérêts de Jean Dausset en génétique des populations humaines, l'apport de l'étude systématique des polymorphismes du génome pour la compréhension des phénomènes de sélection qui ont façonné l'évolution de la diversité génétique humaine. Il a notamment illustré l'effet de sélection darwinienne positive des agents infectieux, notamment sur certains gènes de la famille des récepteurs *Toll like*. Certains des polymorphismes ainsi sélectionnés au cours de l'évolution des populations humaines sont aussi ceux qui prédisposent à certaines maladies inflammatoires ou autoimmunes, conduisant à l'hypothèse que le prix à payer pour une meilleure lutte de l'organisme contre certaines maladies infectieuses a été une plus grande sensibilité aux pathologies impliquant des dysfonctionnements de l'immunité acquise ou innée.

Emmanuel Mignot (Stanford) clôtura la session du vendredi par une conférence sur « Narcolepsie, HLA et cerveau : autoimmunité dirigée contre les neurones hypocrétinergiques ». L'association entre ce trouble très spécifique du sommeil et un allèle HLA DQB1 spécifique, l'une des plus forte des associations HLA-maladies, fut observée en 1988, sans que l'on sache si elle était liée à la présence d'un gène impliqué dans la régulation du sommeil dans la région HLA, ou à un mécanisme pathologique d'autoimmunité. Emmanuel Mignot montra de manière élégante comment, à partir de cette observation initiale, l'étude d'un modèle canin de narcolepsie (impliquant le développement de cartes du génome du chien), et de mutations ciblées dans la souris, permirent de découvrir un nouveau système physiologique impliquant des peptides hypothalamiques (hypocrétines), leurs deux récepteurs, et des neurones spécifiques dits hypocrétinergiques. La démonstration de la disparition de ces neurones dans le cerveau des patients narcoleptiques affirma l'hypothèse auto-immune, mais sans que le l'autoantigène ait pu être identifié. Toutefois, l'allèle HLA DQB1\*0602 présent chez quasiment tous les patients, est assez fréquent dans la population générale, et n'explique donc pas à lui seul une maladie rare comme la narcolepsie. Emmanuel Mignot présenta des données en faveur d'un rôle favorisant d'infections streptococciques, et les résultats très récents de son étude d'association « genome wide » impliquant un variant du locus TCRA (codant pour une chaîne du récepteur des cellules T) et suggérant ainsi un effet très spécifique sur l'interaction HLA -TCR des deux variants HLADQ et TCRA associés à cette pathologie.

Lors de la dernière session, deux conférences abordèrent les perspectives et limites de la médecine prédictive appelée de ses vœux par Jean Dausset. Jean-Pierre Hugot (Paris) décrit les travaux initiés au CEPH avec G. Thomas, qui lui permirent d'identifier le premier gène (NOD2) impliqué dans la prédisposition à la maladie de Crohn, l'un des tous premiers succès dans cette approche de la génétique des maladies communes. Cette découverte majeure ouvrit une nouvelle voie pour la compréhension des mécanismes de la maladie, impliquant les acteurs de l'immunité



innée, mais sans que ceci conduise à l'heure actuelle à une amélioration « personnalisée » de la prise en charge thérapeutique des patients. Depuis, plus d'une trentaine d'autres gènes impliqués dans la prédisposition à la maladie de Crohn ont été identifiés, d'un grand intérêt pour la compréhension physiopathologique, mais qui n'expliquent que très partiellement l'héritabilité estimée de la maladie, et qui ne permettent d'affiner réellement la prédiction du risque que pour une très petite minorité de cas. La situation est différente pour le cancer du sein, qui fut l'objet de la conférence de Dominique Stoppa-Lyonnet (Paris, Institut Curie). L'identification de formes monogéniques liées à des mutations rares des gènes BRCA1 ou BRCA2 a une grande importance pour l'estimation d'un risque majeur (jusqu'à 80 %) de cancer du sein ou de l'ovaire pour les personnes concernées, qui représentent environ 5 % des cancers du sein dans la population. Le diagnostic présymptomatique nécessite des précautions particulières mais peut conduire à des prises en charges thérapeutiques spécifiques. La conférence a illustré la complexité des prédispositions génétiques aux formes communes de cancer du sein, des variants rares du gène ATM (responsables lorsque les 2 allèles sont mutés, d'une maladie sévère, l'ataxie télangiectasie) qui à l'état hétérozygote, multiplient le risque par un facteur de 2 environ, aux polymorphismes fréquents retrouvés dans divers gènes, mais qui n'ont qu'un effet individuel très réduit sur le risque de développer un cancer du sein, et qui n'ont donc aucun intérêt prédictif.

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 (Autisme et génétique, 3 décembre 2008), ainsi qu'un cours (4 h) de génétique humaine multifactorielle dans le cadre d'un master à l'Université de Strasbourg (25 novembre 2009), et 2 cours (sur le syndrome X fragile et sur les approches GWAS) dans le cadre de l'enseignement national du DES de génétique médicale, le 27 janvier 2010. Des conférenciers invités au Collège de France (Marc Tessier-Lavigne et Emmanuel Mignot) ont également donné à mon initiative des conférences très suivies à l'IGBMC.

## RECHERCHE

### **Groupe de recherche en génétique humaine**

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 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 également développés dans le laboratoire hospitalier de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg, dirigé par J.L. Mandel. Jean-Louis Mandel a été directeur, de juin 2008 à décembre 2009, 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) Mécanismes des maladies neuromusculaires : myopathies myotubulaire et centronucléaires et analyse fonctionnelle de la voie des myotubularines (équipe dirigée par J. Laporte, DR2 Inserm) ;

3) Études génétiques du syndrome de Bardet-Biedl, en collaboration avec le Pr Hélène Dollfus (Équipe 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.

### **Équipe AVENIR-INSERM**

L'équipe AVENIR-INSERM de Nicolas Charlet-Berguerand (CR1 Inserm) étudie les mécanismes moléculaires de toxicité d'ARNs avec expansions de répétitions tri ou tétranucléotidiques à l'origine des myotonies dystrophiques et du syndrome FXTAS.

#### *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 cibles au sein de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes. De nombreux travaux suggèrent un rôle de FMRP dans le transport dendritique et la traduction localisée d'ARNm neuronaux importants pour la formation la plasticité synaptique. Afin de caractériser la fonction et les mécanismes d'action de FMRP, nous avons entrepris d'identifier et caractériser des cibles ARNm de FMRP et de rechercher son action sur ces cibles.

## Cibles ARNm de FMRP

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 ; Castet *et al.*, 2005). Nous avons entrepris de rechercher les ARNm neuronaux liés par FMRP contenant le motif G-quartet. Nous avons ainsi identifié la présence d'un consensus G-quartet dans une proportion importante des ARNm connus comme étant localisés dans les dendrites. Nous avons en particulier montré que les ARNm de deux protéines essentielles pour l'activité synaptique, Camk2a et PSD95, se lient à FMRP grâce à un motif G-quartet localisé dans la région 3' non-traduite de ces ARNm (Subramanian *et al.*, soumis). En collaboration avec le Dr B. Bardoni (CNRS, Sophia-Antipolis) nous avons montré que FMRP peut également se lier à un autre type de motif d'ARN constitué d'une succession de trois tige-boucles. Ce nouveau motif a été identifié au niveau du site d'initiation de la traduction de l'ARNm de l'enzyme superoxyde dismutase *SOD1* (Bechara *et al.*, 2009).

## Mécanisme d'action de FMRP sur ses cibles ARNm

Nous avons montré que l'interaction de FMRP avec son propre ARNm, au niveau d'un motif G-quartet présent dans la région codante (exon 15), peut moduler l'épissage alternatif du gène *FMRI*, et pourrait constituer une boucle d'autorégulation de la synthèse de FMRP (Didiot *et al.*, 2008). Nous avons réanalysé l'association proposée par plusieurs laboratoires entre FMRP et le complexe RISC (RNA induced silencing complex). Nous avons montré que FMRP n'est pas nécessaire à l'activité RISC dans les cellules, et présente des propriétés de localisation intracellulaire et d'association aux polysomes distinctes de celles du complexe RISC. Nous avons conclu 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).

Nous avons entrepris de rechercher le rôle de FMRP vis-à-vis d'ARNm cibles neuronaux. Nous avons montré que FMRP stimule la traduction de l'ARNm *SOD1* dans les neurones (Bechara *et al.*, 2009). Les anomalies d'expression de *SOD1* provoquée par l'absence de FMRP pourraient contribuer aux altérations du stress oxydatif observées dans un modèle *FMRI* KO de souris. Pour les ARNm PSD95 et Camk2a qui possèdent un site de fixation de FMRP G-quartet dans leur région 3' non-traduite, nous avons montré que le motif G-quartet était nécessaire et suffisant pour leur adressage au niveau des dendrites et cette activité est modulée par l'activation des récepteurs au glutamate mGluR5. Le motif G-quartet représenterait donc un signal d'adressage des ARNm vers les dendrites (Subramanian *et al.*, soumis) et la liaison de FMRP à ce motif est susceptible d'altérer la localisation de ces ARNm. Nous poursuivons actuellement l'étude du rôle de FMRP dans le transport et la traduction locale des ARNm en utilisant notamment des cultures de neurones primaires de souris déficientes en protéine FMRP.

*Mécanismes de maladies neuromusculaires : Myopathies myotubulaire et centronucléaires et analyse fonctionnelle de la voie des myotubularines*

Équipe dirigée par J. Laporte

Nous étudions les mécanismes pathologiques ainsi que les gènes impliqués dans plusieurs maladies neuromusculaires, et en particulier les myopathies centronucléaires ou myotubulaires. Les myopathies centronucléaires (CNM) regroupent des myopathies rares caractérisées par une grande proportion de fibres musculaires atrophiques 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 des trois 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.

Recherche de nouveaux gènes impliqués et mutations par approches haut débit

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. 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 affectent le taux de la protéine (Tosch *et al.*, 2010). 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 caractérisé d'autres cas de CNM liée à des mutations dans le gène *BIN1*, confirmant l'implication de ce gène. Nous finalisons la comparaison entre génotype et phénotype afin d'identifier de possibles corrélations (Claeys *et al.*, 2010 ; Melberg *et al.*, 2010).

Johann Böhm a récemment identifié une mutation du gène *MTM1* dans une lignée de chien Labrador présentant une faiblesse musculaire progressive et sévère

et une histopathologie proche de la myopathie myotubulaire humaine. Il a montré que cette mutation déstabilise la protéine qui est ubiquitinée et dégradée (Beggs, Böhm *et al.*, 2010). Ce modèle canin représente un outil très important pour tester de possibles approches thérapeutiques car il est plus proche de l'homme que les modèles murins.

#### Rôles cellulaires des protéines impliquées et mécanismes pathologiques

Nous essayons de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques menant aux myopathies centronucléaires et à certaines formes de neuropathies périphériques de Charcot-Marie-Tooth liées à des mutations dans des gènes identiques (DNM2) ou proches homologues (MTM1, MTMR2 et MTMR13). Nous avons montré que les mutations des gènes BIN1 et DNM2 impliquées dans ces maladies affectent certaines des fonctions de ces protéines, mais pas toutes les fonctions connues. Nous poursuivons ces études afin d'identifier les fonctions cellulaires impliquées dans la physiopathologie, et de comprendre pourquoi des mutations de DNM2 sont impliquées soit dans une myopathie centronucléaire soit dans une neuropathie périphérique.

Nous avons identifié des interacteurs des protéines impliquées. Nous avons confirmé que la myotubularine interagit avec la desmine, un filament intermédiaire muté dans les myopathies myofibrillaires et des cardiomyopathies. Des anomalies de la fonction de la desmine sont retrouvées dans nos modèles animaux déficients en myotubularine et dans des biopsies de patients MTM1. 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 d'ATER Collège de France de 2007 à 2008 (Hnia *et al.*, 2010).

#### Modèles animaux et approches thérapeutiques

L'analyse du modèle murin construit au laboratoire, de myopathie myotubulaire (inactivation du gène MTM1) a montré une anomalie précoce de l'orientation des tubules t et de l'homéostasie calcique (Al-Qusairi *et al.*, 2009). Nous avons confirmé ces données d'anomalies des tubules t dans des biopsies de patients et montré des anomalies similaires dans les formes autosomiques récessives et dominantes (Toussaint *et al.*, 2010). Il n'existe pas de modèles animaux pour les myopathies centronucléaires autosomiques dues à des mutations dans les gènes BIN1 et DNM2. Nous avons construit des souris knock-out pour le gène BIN1, en cours d'analyse. Pour réintroduire les mutations dominantes DNM2 causant la myopathie, nous utilisons les Adeno-Associated virus (AAV) pour exprimer ces mutants dans le muscle squelettique de souris sauvage adulte. Des résultats obtenus par le Dr Belinda Cowling (titulaire d'un poste d'ATER Collège de France de 2009 à 2011) suggèrent que les mutations ont un effet de type gain de fonction et excluent un mécanisme d'haploinsuffisance, et montrent que le défaut primaire est d'origine musculaire. L'injection d'autres mutants, dont ceux impliqués dans des neuropathies périphériques est en cours.

## Développements technologiques

Nous avons collaboré avec la plateforme imagerie de l'IGBMC (et notamment avec le Dr. Y. Schwab) pour développer la microscopie corrélative, permettant de lier des phénomènes dynamiques (étude en « *time-lapse* » de protéine-GFP en microscopie confocale à fluorescence) avec la résolution de structures 3D en microscopie électronique après tomographie (Spiegelhalter *et al.*, 2010).

### *Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl*

*(collaboration avec le prof. H. Dollfus) et autres applications du diagnostic génétique*

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 a permis de relier le syndrome BBS à des défauts dans l'assemblage ou la fonction de structures ciliées (cil primaire). Nous participons à une étude initiée par le prof. Hélène Dollfus (INSERM/AVENIR, 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, en collaboration avec l'équipe de bioinformatique d'Olivier Poch à l'IGBMC a permis d'identifier deux nouveaux gènes (BBS10 et BBS12) particulièrement importants car mutés chez plus de 25 % des patients (Stoetzel *et al.*, 2006, 2007 ; Muller *et al.*, 2010). 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 à l'algue *Chlamydomonas*), les gènes BBS10 et BBS12 codent pour des protéines spécifiques des vertébrés, dont la séquence protéique évolue rapidement. BBS10 et BBS12 appartiennent, comme BBS6, à la superfamille des chaperonines de type II (Stoetzel *et al.*, 2007). 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 suggérait 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). Un complexe contenant les protéines BBS6, 10 et 12 a été récemment identifié, qui joue un rôle dans l'assemblage du BBSome (Seo *et al.*, 2010).

La création de mutants avec inactivation conditionnelle des gènes BBS10 et 12 chez la souris est en cours à l'Institut Clinique de la Souris, 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 mis au point des approches de diagnostic moléculaire s'appuyant sur la cartographie d'homozygotie, utiles pour des maladies génétiquement très hétérogènes telles que le syndrome de Bardet-Biedl (Muller *et al.*, 2010), ou les myopathies « des ceintures » (Cossée *et al.*, 2009). Les études de corrélation génotype-phénotype ont montré qu'une forme variante de syndrome de Bardet-Biedl (syndrome McKusick/Kaufmann ou MKKS) précédemment associée à des mutations du gène BBS6, peut se retrouver chez des patients avec des mutations dans d'autres gènes BBS (Schaefer *et al.*, 2010).

Nous avons participé à une grande étude internationale sur le phénotype associé à une délétion récurrente d'un segment de 650 kilobases, précédemment retrouvée dans des cohortes avec retard mental et/ou autisme, avec une fréquence de 0,4-0,6 % environ. Cette délétion a été également retrouvée à une fréquence équivalente dans des cohortes de patients avec obésité importante, et nous avons contribué une cohorte de près de 300 patients avec déficit cognitif et obésité, qui a permis de montrer la fréquence la plus élevée de délétion 16p11.2 (2,7 %) associée à cette combinaison de phénotypes (Walters *et al.*, 2010). Nous avons également collaboré avec l'équipe de bioinformatique dirigée par O. Poch à l'IGBMC, pour la validation d'une nouvelle base de données interactive pour la prédiction des effets de mutations faux sens impliquées dans des maladies génétiques (Friedrich *et al.*, 2010).

### **Maladies à expansion de polyglutamine**

Yvon Trottier, avec K. Mérienne

L'équipe étudie la physiopathologie de la maladie de Huntington (MH) et de l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7). Ces maladies neurodégénératives à transmission dominante sont dues à une expansion de répétitions CAG codant pour un homopolymère de glutamines (polyQ) dans des protéines cibles spécifiques de chaque maladie. Les protéines cibles portent une polyQ polymorphique, toutefois l'expansion au-delà d'environ 39 résidus confère un gain de propriété toxique, qui augmente avec la taille de la polyQ, et qui 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 fonction et la toxicité des polyQ*

Il est proposé qu'au-delà de 39 glutamines, le seuil de toxicité dans la MH, la polyglutamine adopte une conformation stable à la base des propriétés toxiques des protéines mutées. En particulier, cette conformation serait responsable de l'agrégation des protéines mutées sous la forme de supramolécules ultrastructurées toxiques, et altérerait les interactions entre les protéines mutées et leurs partenaires naturels, causant ainsi la dysfonction de ces partenaires. Notre équipe a confronté cette hypothèse de « conformation pathogénique » en conduisant deux types d'études. Dans une première étude en 2007, nous avons combiné des approches biochimiques et biophysiques pour démontrer que les polyQ, quelle que soit leur taille, présentent des propriétés physiques et structurales comparables autant sous la forme soluble, agrégée que lors d'interaction, remettant ainsi en question l'hypothèse conformationnelle (Klein *et al.*, 2007). Seules la cinétique d'agrégation et, dans une moindre mesure, la stabilité des agrégats augmentent avec la taille de la polyQ. Nos données appuient d'autres études indiquant que les polyQ normales et mutées (expansions) sont non structurées au sein de la protéine soluble, mais adoptent une conformation en feuillet beta lors de leur agrégation.

Dans une seconde étude en collaboration avec le Dr. D. Altschuh (ESBS, Illkirch), nous avons étudié l'interaction de la huntingtine (impliquée dans la MH) avec ses interacteurs en utilisant une technique biophysique de haute précision, la résonance plasmonique de surface (BIAcore), qui n'avait jamais été utilisée pour caractériser les interactions de la huntingtine. Cette technique permet de mesurer précisément l'affinité des interactions, alors qu'auparavant seules des techniques peu quantitatives telles que le *GST-pull down*, le double hybride levure et l'immunoprécipitation, avaient été utilisées. Contrairement aux études antérieures, nous avons pris soin de travailler avec des protéines recombinantes bien caractérisées, *i.e.* solubles, monomériques et sans agrégats. Nous avons étudié le partenaire SH3GL3 (endophiline 3), qui est impliqué dans l'endocytose et dont une interaction anormale avec la huntingtine mutée pourrait être responsable de défauts d'endocytose dans la MH. A l'aide de ces outils, nous concluons que SH3GL3 interagit avec la même affinité avec la huntingtine portant une polyQ de taille normale ou de taille mutée. Ces données contredisent à nouveau l'hypothèse conformationnelle. Nous avons montré que l'agrégation de la huntingtine peut entraîner la séquestration d'une protéine partenaire *in vitro*. Nous postulons que les défauts fonctionnels observés dans la MH découleraient, non pas d'anomalie d'interaction de la huntingtine mutée avec ses partenaires, mais de la séquestration de ses partenaires lors du processus d'agrégation, les détournant ainsi de leur fonction cellulaire (manuscrit en préparation). Ces conclusions méritent une attention particulière pour l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Notre étude suggère qu'inhiber l'agrégation de la huntingtine mutée permettrait de prévenir la dysfonction de ses interacteurs ainsi que d'autres mécanismes toxiques des agrégats.



*Mécanismes de toxicité des polyQ dans un modèle souris SCA7*

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 ou non-apoptotique, la migration cellulaire, la dédifférenciation 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 dédifférenciation) sont associées aux stades tardifs (Yefimova *et al.*, 2010).

Nous avons cherché à savoir comment une protéine toxique provoque autant de réponses de la part du photorécepteur. À l'aide de méthodes biochimiques, nous avons étudié les différentes formes de l'ataxine-7 mutée au cours du temps. Nous avons constaté qu'aux stades précoces, lorsque l'apoptose et la prolifération sont observées, l'ataxine-7 mutée est sous forme pleine longueur, mais de multiples fragments protéolytiques solubles portant l'expansion polyQ sont aussi présents. À l'opposé, aux stades tardifs associés avec la migration, la mort non-apoptotique et la dédifférenciation, la forme majeure est un fragment unique de protéolyse retrouvé dans la fraction insoluble et qui est vraisemblablement le principal constituant des inclusions nucléaires observés par immunohistochimie. En conclusion, nos résultats indiquent qu'il existe une grande variété d'entités potentiellement toxiques dérivées de l'ataxine-7 mutée. La nature, la quantité ainsi que le ratio de ces entités varient considérablement des stades précoces aux stades tardifs, ce qui pourrait influencer la façon dont chaque photorécepteur répond au stress protéotoxique (Yefimova *et al.*, 2010). La diversité de la réponse neuronale à la toxicité des polyQ est conceptuellement importante pour le développement des stratégies thérapeutiques.

*Mécanisme d'instabilité somatique des expansions CAG dans la MH*

Avec K. Mérienne, nous nous sommes intéressés à l'instabilité somatique de l'expansion CAG dans la maladie de Huntington (HD), car celle-ci apparaît accélérer la dégénérescence des neurones striataux. En effet, l'instabilité des répétitions CAG, qui augmente avec l'âge, favorise l'apparition d'expansions plus grandes, et donc la production de protéines huntingtine-polyQ plus toxiques.

Cette instabilité est la plus importante dans le striatum, la cible principale de la dégénérescence. Au contraire, elle est faible dans le cervelet, un tissu peu atteint. Le mécanisme d'instabilité, qui reste hypothétique, repose sur la propension des expansions CAG à former des structures secondaires. La prise en charge de ces structures par les mécanismes de réparation de l'ADN serait responsable de l'instabilité. Une étude récente montre que la glycosylase OGG1, enzyme qui initie le mécanisme de réparation des lésions oxydantes (*le Base Excision Repair*, BER), contribue à l'instabilité somatique des expansions CAG dans des souris modèles de HD. Les auteurs de cette étude proposent que l'accumulation de lésions oxydantes avec l'âge promeut l'instabilité somatique. À partir d'un modèle murin HD, nous avons montré que la quantité de lésions oxydantes au niveau de l'expansion CAG est anormalement élevée, mais qu'elle n'augmente pas avec l'âge et qu'elle est comparable dans des tissus présentant des degrés opposés d'instabilité, comme le striatum et le cervelet, indiquant que les lésions oxydantes ne suffisent pas à générer de l'instabilité somatique. En revanche, nos données montrent que la stoechiométrie des enzymes du BER ainsi que les activités qui leur sont associées sont très différentes dans le striatum et dans le cervelet. En particulier, le niveau protéique et l'activité endonucléase de FEN1, enzyme dont l'inactivation chez la levure augmente l'instabilité des expansions CAG, sont 5 à 10 fois supérieurs dans le cervelet comparé au striatum. Nous avons aussi montré que l'ADN Polymérase  $\beta$  (POLb) est fortement enrichie sur l'expansion CAG, dans le striatum mais pas dans le cervelet, suggérant que POLb contribue à l'instabilité somatique des CAG. POL $\beta$  et FEN1 fonctionnent de pair dans la voie nommée long-patch-BER, la première en synthétisant l'ADN, la seconde en éliminant le brin « *flap* » généré par l'étape de synthèse. Nos données *in vitro* montrent que l'activité de déplacement de brin de POLb est modulée par la quantité de FEN1. Nous proposons que la coordination entre les étapes médiées par POLb et FEN1 lors de la réparation d'une lésion oxydante sur les CAG est insuffisante dans le striatum, et favorise la formation de structures secondaires menant à l'instabilité. Nos résultats indiquent donc que la stoechiométrie des enzymes du BER contribue à la sélectivité tissulaire du processus d'instabilité somatique des expansions CAG (Goula *et al.*, 2009).

### **Mécanismes normaux et pathologiques impliqués dans les ataxies récessives avec dysfonction mitochondriale**

Équipe H. Puccio

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de trois 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*.

Les ataxies héréditaires constituent un groupe hétérogène de pathologies neurodégénératives caractérisées par des anomalies de coordination des mouvements

associées à des troubles de l'équilibre et de la marche. Cette perturbation de la coordination des mouvements volontaires peut-être due à une atteinte du cervelet et de ses connections afférentes et efférentes, ou à une atteinte des voies proprioceptives. Depuis 15 ans, 14 gènes responsables d'ataxies récessives dégénératives ont été identifiés. L'étude des fonctions des protéines codées par ces gènes a un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'orientation des stratégies thérapeutiques. Deux grandes voies sont impliquées dans la plupart des ataxies récessives : une dysfonction mitochondriale et/ou un stress oxydant, et une dysfonction des processus de réparation de l'ADN. En particulier, cinq ataxies sont liées à une dysfonction mitochondriale affectant la chaîne respiratoire.

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur la physiopathologie de l'ataxie de Friedreich, la plus fréquente des ataxies héréditaires. L'ataxie de Friedreich (AF) 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. Notre équipe a créé 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 physio-pathologiques et biochimiques de la pathologie humaine. Ils ont permis de montrer que le déficit en protéine à centre Fe-S était une conséquence primaire du 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).

#### *Fonction de la frataxine dans l'assemblage des centres Fe-S*

Afin de déterminer la fonction de la frataxine, nous avons entrepris des analyses d'interactions par des approches combinant des immunoprécipitations et des « *GST pull-downs* » à la spectrométrie de masse. Nous avons montré que la frataxine interagit majoritairement avec les composants de la machinerie de biosynthèse des centres Fe-S. La frataxine interagit de manière stable avec un complexe préformé composé des 3 protéines NFS1, ISD11 et ISCU, la cystéine désulfurase qui donne le soufre et la protéine échafaudage pour l'assemblage. Par mutagenèse dirigée, nous avons identifié les surfaces d'interaction sur la frataxine. Par une approche utilisant un système cellulaire (Calmels *et al.*, 2009), nous avons montré que la déstabilisation de la formation du complexe FXN/ISCU/NFS1/ISD11 par introduction de mutations ponctuelles dans la frataxine, induisait un phénotype très sévère, voir la mort cellulaire. La purification de ce complexe nous a permis de montrer la présence d'un centre Fe-S. Nous proposons que la frataxine joue un rôle de modulateur de la biosynthèse en stabilisant l'interaction entre ISCU et NFS1/ISD11 et de protection du centre Fe-S en cours de formation. Ces données remettent en cause les rôles (contradictoires) précédemment attribués à la frataxine,

soit comme donneur de fer pour la biosynthèse des centres Fe-S ou comme régulateur en inhibant la formation des centres Fe-S. Nos données nous permettent de proposer un nouveau modèle de biosynthèse *de novo* des centres Fe-S. Bien que la biosynthèse *de novo* puisse se produire sans la frataxine à un niveau minimal, nous proposons que la fonction de la frataxine est de faciliter la biosynthèse des centres Fe-S et/ou leur transfert aux apoprotéines en maintenant l'interaction entre ISCU/NFS1/ISD11. En absence de frataxine, comme l'interaction entre ISCU et NFS1/ISD11 est instable et très dynamique, l'efficacité de l'assemblage des centres Fe-S et de leur transfert est plus faible (S. Schmucker *et al.*, soumis).

*Modélisation de l'ataxie de Friedreich par le développement de cellules souches pluripotentes induites portant des expansions (GAA)<sub>n</sub> 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 (AF). En effet, la mutation majoritaire (96 % des patients) est une expansion (GAA)<sub>n</sub> intronique conduisant à une hétérochromatinisation du locus. Le caractère instable du (GAA)<sub>n</sub> rend la génération de modèles murins et cellulaires portant un (GAA)<sub>n</sub> très compliqué. À l'heure actuelle, le meilleur modèle murin avec expansion (GAA)<sub>n</sub> ne présente pas d'ataxie sévère. Nous avons créé des modèles murins par recombinaison homologue inactivant le gène frataxine 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 de deux patients AF adulte (taille de l'expansion GAA 600/830 et 430/900) et un individu contrôle par transduction avec des lentivirus exprimant les facteurs de pluripotence Oct4, Sox2, Lin28 and Nanog. Après reprogrammation, le (GAA)<sub>n</sub> est instable mais reste à une taille pathogénique (n = 500 à 900) et induit un taux faible d'expression de la frataxine, démontrant que les facteurs épigénétiques liés à la mutation sont conservés lors de la reprogrammation. 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) qui expriment des marqueurs des trois feuillettes embryonnaires. Par ailleurs, après injection dans des souris nues, nous obtenons des tératomes issus des trois feuillettes embryonnaires, démontrant le potentiel pluripotent des cellules reprogrammées. Nos résultats démontrent que les clones obtenus sont des cellules souches induites. Nous avons mis au point un protocole pour différencier les iPS en neurones, en passant par un stage de neurosphères. La caractérisation des neurosphères et neurones est en cours et ce modèle reproduisant

l'effet de la mutation par expansion dans des neurones humains nous permettra de mieux analyser les mécanismes physiopathologiques de la maladie, et de tester des molécules pouvant augmenter la synthèse de frataxine.

Les iPS contrôles ont déjà été utilisé pour dériver une lignée érythrocytaire en collaboration avec l'équipe du Prof. Luc Douay (INSERM UMR S938) (Lapapillone *et al.*, 2010).

#### *Développement de modèles murins pour une nouvelle forme d'ataxie récessive : ARCA2*

Une nouvelle forme d'ataxie récessive associée à un déficit en Coenzyme Q10 (CoQ10) ARCA2 (*Autosomal recessive cerebellar ataxie type 2*) a été identifiée en 2008 par l'équipe de Michel Koenig comme étant due à des mutations dans le gène ADCK3. Les patients présentent une ataxie cérébelleuse modérée débutant avant l'adolescence et une atrophie cérébelleuse. La maladie est lentement progressive. ADCK3 est une kinase mitochondriale impliquée dans la régulation de la synthèse du coenzyme Q10, un lipide essentiel au transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette ataxie est la cinquième forme d'ataxie récessive due à un déficit d'une protéine mitochondriale, confirmant que le dysfonctionnement de cette organelle est la cause directe des mécanismes dégénératifs des voies cérébelleuses et spinocérébelleuses dans un nombre important de cas. L'analyse bioinformatique de la séquence ADCK3 et des protéines apparentées montre qu'elles forment une famille de kinases ancestrales ayant de lointaines similitudes avec les phosphoinositide-kinases et les choline-kinases. L'observation d'un déficit modéré en CoQ10 chez les patients ARCA2, et l'homologie avec les kinases suggèrent qu'ADCK3 a un rôle régulateur plutôt qu'un rôle enzymatique direct dans la biosynthèse du CoQ10. Le phénotype relativement modéré des patients ARCA2, par rapport aux patients présentant un bloc direct de la biosynthèse du CoQ10, pourrait être expliqué par un tel rôle régulateur.

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. La délétion constitutive d'*Adck3* n'entraîne pas de létalité embryonnaire, et les souris développent dès la 10<sup>e</sup> semaine post natale un phénotype neurologique avec ataxie. Un phénotypage approfondi est en cours. En parallèle, nous développons des approches biochimiques pour identifier la fonction d'ADCK3 dans la biosynthèse du coenzyme Q10.

#### *Génétique moléculaire des ataxies récessives*

Équipe M. Koenig

En 2009, nous avons identifié un nouveau gène d'ataxie récessive codant pour une protéine de fonction inconnue, contenant un domaine RUN et un domaine DAG-like (domaine potentiel de liaison au diacylglycérol) que nous avons baptisée rundataxine (Assoum *et al.*, 2010).

Nous avons depuis identifié un autre gène d'ataxie récessive par l'étude de 4 familles consanguines originaires de la région de Sétif (Algérie). L'analyse de cartographie par homozygotie a révélé que ces 4 familles étaient liées, par un effet fondateur, au locus 20p12-q12, chevauchant avec le locus SCAR6 précédemment décrit. L'analyse clinique a révélé que ces familles de Sétif avaient en fait le syndrome PHARC (polyneuropathie, hypoacousie, ataxie, rétinite pigmentaire et cataracte), également lié à ce locus. Le séquençage des gènes de la région candidate commune aux 4 familles a révélé une duplication de 7 nucléotides dans l'exon 9 du gène de l'alpha/beta hydrolase 12 (ABHD12). L'un des substrats de cette enzyme, exprimée de façon ubiquitaire, est le 2-arachidonyl-glycérol, l'un des deux endocannabinoïdes majeurs du système nerveux central. Bien que d'autres enzymes (MAGL, ABHD6) soient principalement responsables de la dégradation du 2-arachidonyl-glycérol dans les neurones, ABHD12 pourrait avoir un rôle majeur dans les cellules gliales où il est majoritairement exprimé et ainsi perturber de façon spécifique le métabolisme des endocannabinoïdes lorsqu'il est muté. Nous avons également trouvé une délétion homozygote de 14kb emportant l'exon 1 et le promoteur d'ABHD12 dans une famille des Emirats Arabes Unis dont les trois enfants atteints présentaient une forme sévère du syndrome PHARC. L'ensemble de ces résultats a été publié (Fiskerstrand *et al.*, 2010) en collaboration avec le groupe du Pr P.M. Knappskog, qui avait initialement identifié et cartographié le syndrome PHARC dans des familles norvégiennes et qui avait identifié indépendamment le gène ABHD12. Une cinquième grande famille de Sétif liée au locus 20p12-q12 ne porte pas de mutation ABHD12 et correspond vraisemblablement au syndrome SCAR6, dont le gène reste à découvrir.

Les deux gènes d'ataxie récessive que nous venons d'identifier (rundataxine et ABHD12) démontrent la très grande diversité des mécanismes responsables d'ataxie récessive puisqu'ils codent pour des protéines très vraisemblablement associées aux membranes plasmiques et/ou vésiculaires (expériences en cours) alors que la majorité des gènes d'ataxie récessive précédemment identifiés codent pour des protéines mitochondriales ou des protéines nucléaires.

Nous avons publié une étude de l'efficacité de la stratégie de cartographie par homozygotie dans l'aide au diagnostic des ataxies récessives. Cette approche nous a permis de faire le diagnostic moléculaire dans 10 familles sur 97 analysées (l'ataxie de Friedreich et l'ataxie par déficit en vitamine E ayant été préalablement exclues). Ceci indique que de nombreux autres gènes d'ataxie récessive restent à découvrir. En particulier, nous avons identifié une famille avec quatre enfants atteints, liée au locus 11q21-q23.3 contenant les gènes d'ataxie récessive ATM et MRE11. L'absence de mutation dans ces deux gènes et la présentation clinique et paraclinique distincte par rapport aux tableaux AT et ATLD (résultant des mutations d'ATM et MRE11, respectivement) démontre que cette famille ségrège une mutation dans un troisième gène d'ataxie récessive localisé en 11q21-q23.3 (H'mida-Ben Brahim *et al.*, 2010). L'identification de ce gène est en cours par une stratégie de séquençage à haut débit.

## Syndrome de Coffin-Lowry et kinase RSK2

A. Hanauer

Le groupe d'André Hanauer étudie le mécanisme physiopathologique du retard mental du 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. Elles présentent un retard de croissance osseuse et des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale. L'équipe a récemment mis en évidence des anomalies de la voie dopaminergique au niveau du cortex de ces souris. Une autre étude, collaborative, a montré que dans des conditions physiologiques normales RSK2 régulait négativement l'allongement des axones *via* la voie de signalisation MAPK/ERK (Fisher *et al.*, 2009).

### Étude transcriptomique

Une étude transcriptomique d'hippocampe de souris invalidées pour RSK2 a été réalisée au moyen de puces Affymetrix. Elle a révélé des altérations d'expression significatives de 100 gènes (altération d'expression supérieure à 1,5 fois avec une p-value < 0,03). Environ deux tiers de ces gènes montrent une expression augmentée chez les souris KO-RSK2 et le tiers restant une expression diminuée. Une analyse avec « *Ingenuity Pathway Analysis* » a identifié cinq réseaux de gènes. Le réseau avec le score le plus élevé est associé avec le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire. Les autres réseaux sont associés au développement et la fonction du système nerveux, ou à la mort cellulaire. Cinq gènes étaient impliqués dans des phénotypes comportementaux. Nos travaux en cours sont basés sur les résultats de cette étude transcriptomique.

### Analyse fonctionnelle des récepteurs AMPA

Le gène GRIA2, qui est surexprimé (d'environ 2 fois) chez les souris KO-RSK2, code pour la sous-unité GluR2 du récepteur ionotrope AMPA. Ce récepteur est impliqué dans la composante rapide du courant exciteur post-synaptique des neurones du système nerveux central. Les récepteurs AMPA ont aussi un rôle crucial dans le développement neuronal et la plasticité synaptique. Nous avons confirmé le niveau élevé d'expression de GluR2 dans l'hippocampe des souris KO-RSK2 par hybridation *in situ*. Nous avons aussi montré que le site R/G (codon 764) du message GluR2 était partiellement édité chez les souris WT (61 % +/- 4 %), en accord avec les données publiées. Chez les souris KO-RSK2 ce site est édité de façon significativement plus faible (43 % +/- 3 %). Nous avons aussi montré que le ratio des formes alternatives « Flip/Flop » (épissage alternatif de 2 exons) est modérément altéré chez les souris KO-RSK2. Ces altérations paraissent spécifiques à GluR2, car elles ne sont pas retrouvées pour GluR1 et GluR3. Le site éditeur R/G et les cassettes flip/flop jouent un rôle important dans la désensibilisation du récepteur. Ces résultats suggèrent que RSK2 joue un rôle dans les mécanismes d'épissage alternatif et d'édition du mRNA GluR2.

Nous avons ensuite réalisé une étude d'imagerie calcique dans des cultures primaires de neurones hippocampiques stimulés par l'AMPA (« *desensitizing condition* ») ou par AMPA + cyclothiazide (« *non-desensitizing condition* »). Nos résultats montrent que significativement plus de cellules sont marquées par le cobalt chez les souris WT que chez les souris KO et suggèrent que la transmission rapide du courant exciteur post-synaptique est affectée chez les souris KO-RSK2. Pour le vérifier nous avons réalisé des expériences d'enregistrement extracellulaire de la transmission synaptique AMPA : courbe *input-output* (fEPSP) et un protocole de plasticité à court terme (PPF) sur tranches de cerveau en collaboration avec Nathalie Rouach (Inserm U840, Collège de France). Les résultats montrent qu'il y a une réduction d'environ 20 % de la transmission AMPA chez les souris KO par rapport aux WT. Par contre il n'y a pas de différence de PPF, indiquant que la libération de glutamate présynaptique n'est pas altérée (Mehmood *et al.*, 2010).

#### *Fonction anti-apoptotique de RSK2*

Un tiers des gènes dont l'expression est altérée chez les souris KO-RSK2 ont été impliqués dans la mort cellulaire, (exemples : DIABLO, GRIA2, PTGS2, IGF1, SOD2, RB1, RUNX2...). Afin d'étudier les conséquences de l'absence de RSK2 sur la prolifération et la survie cellulaire, nous avons analysé l'effet de la staurosporine sur des cultures primaires de neurones hippocampaux. Les résultats montrent que les cellules déficientes pour RSK2 sont plus sensibles à cette drogue, le nombre de neurones apoptotiques étant significativement plus élevé dans les lignées de souris KO que de WT après traitement. D'autre part, un marquage immunohistochimique *in situ* au BrdU a révélé une diminution de la survie des neurones hippocampaux des animaux KO-RSK2, alors que leur prolifération ne semble pas affectée. Ces résultats suggèrent une altération du processus de survie cellulaire chez les souris KO-RSK2, en faveur d'un rôle anti-apoptotique de RSK2.

### **Étude des bases moléculaires des dystrophies myotoniques et d'une autre pathologie à expansion et ARN toxique**

N. Charlet-Berguerand

Les dystrophies myotoniques (DM) sont les formes adultes les plus communes de dystrophies musculaires. Les patients atteints de ces maladies souffrent d'une myotonie, d'un affaiblissement des muscles squelettiques, d'arythmies et de troubles de la conduction cardiaque, ainsi que de cataracte, de résistance à l'insuline et de troubles de la personnalité. Les dystrophies myotoniques sont dues à l'expansion et l'expression en ARN de répétitions non-codantes du trinucéotide CTG dans la région 3' non traduite du gène *DMPK* (DM1, la forme la plus fréquente), ou du tétranucléotide CCTG dans un intron du gène *ZNF9* (DM2). Au cours d'un stage postdoctoral dans le laboratoire du prof. M. Cooper (Houston), nous avons montré que l'accumulation de l'ARNm comportant de longues expansions de CUG sous forme de foci nucléaires entraînait une séquestration d'un facteur d'épissage



(*muscleblind*) et des anomalies d'épissage affectant l'expression d'un canal chlore et expliquant le phénotype de myotonie (Charlet-B. *et al.*, 2002).

Malgré l'importance des travaux effectués sur les dystrophies myotoniques, qui ont conduit à démontrer un mécanisme par toxicité d'ARN, de nombreux points restent à élucider. Notamment, les causes de l'arythmie cardiaque et des troubles de la conduction cardiaque sont inconnues. De plus, il n'existe pas de thérapie pour ces maladies.

Une jeune équipe (INSERM AVENIR) a été créée en 2006 pour étudier les bases moléculaires à l'origine des Dystrophies Myotoniques. Nos principaux objectifs sont : 1) Identifier les causes de la dystrophie musculaire et des troubles cardiaques observés dans les DM. 2) Identifier des molécules pouvant inhiber l'effet pathogène des répétitions CTG et CCTG. Plus récemment, nous avons entrepris des travaux sur les mécanismes d'une autre pathologie par expansion trinuécléotidique entraînant la production d'un ARN toxique, le syndrome FXTAS (*Fragile X Tremor Ataxia syndrome*). Nous avons montré que le mRNA FMR1 comportant des expansions de répétitions CGG forme des agrégats nucléaires qui séquestrent la protéine Sam68 impliquée dans la régulation d'épissages alternatifs, et diminuent ainsi son activité, entraînant des anomalies d'épissage. La phosphorylation de Sam68 module sa localisation dans les agrégats CGG, et la formation de ces agrégats est inhibée par la tautomycine, suggérant une cible thérapeutique potentielle (Sellier *et al.*, 2010).

En collaboration avec l'équipe de Denis Furling (Institut de myologie, Paris) et de Jocelyn Laporte (IGBMC), nous avons ainsi découvert une altération spécifique de l'épissage des transcrits BIN1 chez les patients DM. Des mutations de BIN1 conduisent à des myopathies centronucléaires, et nous avons montré que des souris reproduisant cette altération de l'expression de BIN1 développent une faiblesse musculaire évoquant celle observée chez les patients DM.

Nous avons identifié pour la première fois une altération spécifique de l'expression de micros ARN chez les patients DM, notamment de la maturation de miR-1 dans des échantillons de cœur de patients DM1. miR-1 est un micro ARN crucial pour le bon fonctionnement du cœur adulte, et son invalidation chez la souris conduit à une arythmie et des troubles de la conduction cardiaque.

Enfin, nous avons criblé plusieurs chimiothèques totalisant ~ 10 000 molécules. Nous avons identifié une dizaine de molécules capables d'inhiber l'effet pathogène des répétitions CTG *in vitro*, et l'analyse de ces molécules *in cellulo* est en cours. En cas de succès, nos études pourraient constituer une première étape vers la découverte de composés pharmacologiques d'intérêt thérapeutique.

#### RESPONSABILITÉS ET DISTINCTIONS (J.L. MANDEL)

Jean-Louis Mandel a assuré jusqu'au 1<sup>er</sup> octobre 2009 la fonction de directeur adjoint de l'IGBMC, et de directeur (jusqu'en décembre 2009) de l'Institut clinique de la souris (ICS). En décembre 2008 il a été nommé 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.

Prix de l'Académie nationale de médecine (Paris, 2009) pour les travaux sur les « Maladies monogéniques neurologiques : de l'identification des gènes aux applications diagnostiques et à l'analyse des mécanismes physiopathologiques ».

#### PUBLICATIONS DU GROUPE DE GÉNÉTIQUE HUMAINE DE L'IGBMC

La liste ci-dessous référence les publications depuis juillet 2009.

#### 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. et Buj-Bello A., « T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase », *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 2009, 106,18763-18768.

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

Fischer M., Pereira P.M., 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.

Friedrich A., Garnier N., Gagnière N., Nguyen H., Albou L-Ph., Biancalana V., Bettler E., Deléage G., Lecompte O., Muller J., Moras D., Mandel J.L., Toursel T., Moulinier L. and Poch O., « SM2PH-db: an interactive system for the integrated analysis of phenotypic consequences of missense mutations in proteins involved in human genetic diseases », *Human Mut.*, 2009, 31, 127-135.

Goula A.Y., Berquist B.R., Wilson D.M. 3rd, Wheeler V.C., Trottier Y. and 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 Genetics*, 2009, 5(12)e1000749.

Anheim M., 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*, 11, 2010, 1-12.

Assoum M., Salih M.A., Drouot N., H'Mida-Ben Brahim D., Lagier-Tourenne C., AlDrees A., Elmalik S.A., Ahmed T.S., Seidahmed M.Z., Kabiraj M.M., Koenig M., « Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia », *Brain*, 2010 Aug, 133(Pt 8):2439-47 ; PubMed PMID: 20826435.

Braida C., Stefanatos R.K., Adam B., Mahajan N., Smeets H.J., Niel F., Goizet C., Arveiler B., Koenig M., Lagier-Tourenne C., Mandel J.L., Faber C.G., de Die-Smulders C.E., Spaans F., Monckton D.G., « Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients », *Hum. Mol. Genet.*, 19(8), 2010 Apr 15, 1399-412.

Clayes K.G., Maissonobe T., Böhm J., Laporte J., Hezode M., Romero N.B., Brochier G., Bitoun M., Carlier R.Y., Stojkovic T., « Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation », *Neurology*, 74, 2010, 519-521.

Fiskerstrand T., H'mida-Ben Brahim D., Johansson S., M'zahem A., Haukanes B.I., Drouot N., Zimmermann J., Cole A.J., Vedeler C., Bredrup C., Assoum M., Tazir M., Klockgether T., Hamri A., Steen V.M., Boman H., Bindoff L.A., Koenig M., Knappskog P.M., « Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism », *Am. J. Hum. Genet.*, 87(3), 2010 Sep 10, 410-7.

Fourcade S., Ruiz M., Guilera C., Hahnen E., Brichta L., Naudi A., Portero-Otín M., Dacremont G., Cartier N., Wanders R., Kemp S., Mandel J.L., Wirth B., Pamplona R., Aubourg P., Pujol A., « Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked Adrenoleukodystrophy », *Hum. Mol. Genet.*, 2010 Feb 23.

Friedrich A., Garnier N., Gagniere N., Nguyen H., Albou L.P., Biancalana V., Bettler E., Deleage G., Lecompte O., Muller J., Moras D., Mandel J.L., Tousel T., Moulinier L., Poch O., « SM2PH-db: an interactive system for the integrated analysis of phenotypic consequences of missense mutations in proteins involved in human genetic diseases », *Hum. Mutat.*, 31, 2010, 127-135

H'mida-Ben Brahim D., M'zahem A., Assoum M., Bouhhal Y., Fattori F., Anheim M., Ali-Pacha L., Ferrat F., Chaouch M., Lagier-Tourenne C., Drouot N., Thibaut C., Benhassine T., Sifi Y., Stoppa-Lyonnet D., N'guyen K., Poujet J., Hamri A., Hentati F., Amouri R., Santorelli F.M., Tazir M., Koenig M., « Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays », *J. Neurol.*, 2010 Aug 27 [Epub ahead of print] PubMed PMID, 20798953.

Landles C., Sathasivam K., Weiss A., Woodman B., Moffitt H., Finkbeiner S., Banghua S., Gafni J., Ellerby L.M., Trottier Y., Richards W.G., Osmand A., Paganetti P. et Bates G.P., « Proteolysis of mutant huntingtin produces an exon 1 fragment that accumulates as an aggregated protein in neuronal nuclei in Huntington Disease », *J. Biol. Chem.*, 285, 2010, 8808-8823.

Lapillonne H., Kobari L., Mazurier C., Tropel P., Giarratana M.C., Zanella-Cleon I., Kiger L., Wattenhofer-Donzé M., Puccio H., Hebert N., Francina A., Andreu G., Viville S. et Douay L., « Red blood cells generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine », *Haematologica*, 95, 2010, 1651-9.

McClelland V., Cullup T., Bodi I., Ruddy D., Buj-Bello A., Biancalana V., Boehm J., Bitoun M., Miller O., Jan W., Menson E., Amaya L., Trounce J., Laporte J., Mohammed S., Sewry C., Raiman J., Jungbluth H., « Vici syndrome associated with sensorineural hearing loss and evidence of neuromuscular involvement on muscle biopsy », *Am. J. Med. Genet.*, 2010, A 152A, 741-747.

Mehmood T.\*, Schneider A.\*, Sibille J., Marques Pereira P., Pannetier S., Ammar M., Dembele D., Thibault-Carpentier C., Rouach N., Hanauer A., « Expression profiling reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the Rsk2 knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry Syndrome », *Hum. Genet.*, 2010 Nov 30.

Melberg A., Kretz C., Kalimo H., Wallgren-Petersson C., Toussaint A., Bohm J., Stalberg E., Laporte J., « Adult course in dynamin 2 dominant centronuclear myopathy with neonatal onset », *Neuromuscul. Disord.*, 20, 2010, 53-56.

Muller J., Stoetzel C., Vincent M.C., Leitch C.C., Laurier V., Danse J.M., Hellé S., Marion V., Bennouna-Greene V., Vicaire S., Megarbane A., Kaplan J., Drouin-Garraud V., Hamdani M., Sigaudy S., Francannet C., Roume J., Bitoun P., Goldenberg A., Philip N., Odent S., Green J., Cossée M., Davis E.E., Katsanis N., Bonneau D., Verloes A., Poch O., Mandel J.L. et Dollfus H., « Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease », *Hum. Genet.*, 2010, sous presse (online doi:10.1007/s00439-010-0804-9).

Pereira P.M., Schneider A., Pannetier S., Heron D., Hanauer A., « Coffin-Lowry syndrome », *Eur. J. Hum. Genet.*, 2010, 18, 627-633.

Quinzii C.M., López L.C., Gilkerson R.W., Dorado B., Coku J., Naini A.B., Lagier-Tourenne C., Schuelke M., Salviati L., Carrozzo R., Santorelli F., Rahman S., Tazir M., Koenig M., Dimauro S., Hirano M., « Reactive oxygen species, oxidative stress, and cell death correlate with level of CoQ10 deficiency », *FASEB J.*, 2010 May 21 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20495179.

Schmucker S., Puccio H., « Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches », *Hum. Mol. Genet.*, 2010, 19 R103-10.

Sellier C., Rau F., Liu Y., Tassone F., Hukema R.K., Gattoni R., Schneider A., Richard S., Willmsen R., Elliott D.J., Hagerman P.J., Charlet-Berguerand N., « Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients », *EMBO J.*, 29(7), 2010, 1248-61.

Spiegelhalter C., Tosch V., Hentsch D., Koch M., Kessler P., Schwab Y., Laporte J., « From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy », *PLoS One*, 2010, 5 e9014.

Walters R.G., Jacquemont S., Valsesia A., de Smith A. J., Martinet D., Andersson J., Falchi M., Chen F., Andrieux J., Lobbens S., Delobel B., Stutzmann F., El-Sayed Moustafa J.S., Chèvre J.-C., Lecoeur C., Vatin V., Bouquillon S., Buxton J.L., Boute O., Holder-Espinasse M., Cuisset J.-M., Lemaitre M.-P., Ambresin A.-E., Brioschi A., Gaillard M., Giusti V., Fellmann F., Ferrarini A., Hadjikhani N., Campion D., Guilmatre A., Goldenberg A., Calmels N., Mandel J.-L., Le Caignec C., David A., Isidor B., Cordier M.-P., Dupuis-Girod S., Labalme A., Sanlaville D., Béri-Dexheimer M., Jonveaux P., Leheup B., Óunap K., Bochukova E.G., Henning E., Keogh J., Ellis R.J., MacDermot K.D., Van Haelst M.M., Vincent-Delorme C., Plessis G., Touraine R., Philippe A., Malan V., Mathieu-Dramard M., Chiesa J., Blaumeiser B., Kooy R.F., Caiazzo R., Pigeyre M., Balkau B., Sladek R., Bergmann S., Mooser V., Waterworth D., Reymond A., Vollenweider P., Waeber G., Kurg A., Palta P., Esko T., Metspalu A., Nelis M., Elliott P., Hartikainen A.-L., McCarthy M.I., Peltonen L., Carlsson L., Jacobson P., Sjöström L., Huang N., Hurles M.E., O'Rahilly S., Farooqi I.S., Männik K., Jarvelin M.-R., Pattou F., Meyre D., Walley A.J., Coin L.J.M., Blakemore A.I.F., Froguel P. et Beckmann J.S., « A new highly-penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2 », *Nature*, 2010, 463, 671-676.

Yefimova M.G., Messaddeq N., Jacquard C., Karam A., Weber C., Jonet L., Wolftrum U., Jeanny J.C., Trottier Y., « Rod photoreceptor remodeling and proliferation counteract degeneration induced by polyglutamine toxicity in SCA7 mice », *Neurobiol. Dis.*, 2010, sous presse.

## **Autres publications**

Mandel J.L., Lathrop M., Cann H.M., « Jean B Dausset, 19 October 1916-6 June 2009 », *Eur. J. Hum. Genet.*, 2009, 17, 1365-1366.

## CONFÉRENCES ET CONGRÈS

De J.-L. Mandel, juillet 2009 - juin 2010 :

- Safety Pharmacology Society Meeting (Strasbourg), 15 au 19 septembre 2009. Conférence : « Phenotyping of genetically engineered mouse models for drug target validation » ;

- Journées Jean Dausset – Collège de France (Paris), 8 et 9 janvier 2010, *coorganisateur* ;
- 5<sup>e</sup> Assises de génétique humaine et médicale de Strasbourg (Strasbourg), 28-30 janvier 2010. *Président du conseil scientifique et membre du comité d'organisation (1 400 participants)* ;
- Strasbourg-Weizmann symposium on « Advances in studies of innate immune defenses, disease models and development » (Rehovot, Israel), 8 et 9 février 2010. Conférence : « Centronuclear myopathies: an unexpected link between phosphoinositides, dynamin 2 and amphiphysin » ;
- XII<sup>e</sup> Congrès de la Société de médecine de la reproduction (SMR) (Strasbourg), les 20 et 21 mai 2010. Conférence plénière : « Quelle perspective pour la génétique ? » ;
- Journées nationales de la Société française de psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent et des disciplines associées (Strasbourg), les 28 et 29 mai 2010. Conférence : « Transmission et génétique : de la transmission au diagnostic prédictif » ;
- Réunion de la Société française pour l'étude des erreurs innées du métabolisme (Strasbourg) les 25 et 26 juin 2010. Conférence : « Aspects génétiques des maladies liées au chromosome X ».

### Conférences grand public

Conférence « La biologie du développement, une science du XXI<sup>e</sup> siècle », avec Julien Vermot, Centre culturel Illiade (Illkirch), le 14 octobre 2010, à l'occasion du 1<sup>er</sup> symposium international IGBMC « New Frontiers in Cell and Developmental Biology ».

Conférence « Notre patrimoine génétique peut-il prédire notre santé ? », Centre communautaire israélite (Strasbourg), le 24 novembre 2009.

Réunion de l'Association nationale du syndrome X fragile « Le Goéland » (Angers) les 14 et 15 mai 2010. Conférence : « De l'ignorance de la maladie au premier essai thérapeutique : point sur la recherche » *Président d'honneur de la réunion*.

### PARTICIPATION À DES PROJETS EUROPÉENS

L'équipe d'Hélène Puccio fait partie d'un consortium européen, EFACTS (The European Friedreich Ataxia Consortium for Translational Studies) financé par le 7<sup>e</sup> programme cadre (FP7) de la Commission européenne. Ce consortium implique 14 partenaires à travers l'Europe et un partenaire industriel aux États-Unis pour une durée de 4 ans (2010-2014).

Jean-Louis Mandel participe au projet FP7 Gencodys (Genetic and epigenetic networks in cognitive dysfunction), projet FP7, 2010-2015, qui réunit 11 partenaires européens.

En tant que directeur de l'Institut Clinique de la Souris (ICS), jusqu'au 1<sup>er</sup> janvier 2010, Jean-Louis Mandel a participé activement aux projets européens de génomique fonctionnelle de la souris : EUCOMM (Production de souris avec inactivation conditionnelle de gènes), EUMODIC (Phénotypage systématique de souris avec inactivation de gène), 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).

