

## Génétique humaine

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

### BIAIS DE SEXE ET MALADIES : QUELS MÉCANISMES GÉNÉTIQUES OU ÉPIGÉNÉTIQUES POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉS ?

Une série de quatre cours (2 et 9 novembre 2011) et un colloque (23 novembre) ont été consacrés à ce thème d'une grande importance mais dont les aspects mécanistiques sont le plus souvent très mal connus. En effet, les données épidémiologiques montrent que de nombreuses maladies affectent de manière différentielle les hommes et les femmes. Dans certains cas, l'explication de ce biais de sexe est évidente, par exemple lorsque la pathologie affecte un organe spécifique d'un sexe (cancer de la prostate ou cancer du sein), ou qu'elle est directement liée aux effets des hormones sexuelles (ostéoporose post-ménopausique), ou encore lorsqu'elle est associée à des différences environnementales ou culturelles dépendantes du genre (le sex-ratio des patients atteints du cancer du poumon est lié à l'évolution des habitudes de consommation de tabac dans chacun des deux sexes). Par ailleurs, les pathologies génétiques impliquant un gène situé sur le chromosome X (hémophilie A et B, myopathie de Duchenne, etc.) affectent spécifiquement (ou beaucoup plus sévèrement) les garçons qui n'ont qu'un seul chromosome X, alors que chez la femme porteuse d'une telle mutation, l'allèle sain porté par son 2<sup>e</sup> chromosome X peut compenser au moins partiellement l'effet fonctionnel de l'allèle muté. Toutefois, il existe quelques exceptions, telles que le syndrome de Rett, qui n'apparaît quasiment que chez les filles, alors que le gène muté est lui aussi localisé sur le chromosome X. Pour de nombreuses autres pathologies (autisme, retard mental, maladies auto-immunes, maladie de Hirschsprung), en revanche, les différences de susceptibilité entre les deux sexes restent très largement inexplicées, et l'essentiel des cours et du colloque a porté sur les données et hypothèses mécanistiques qui peuvent permettre de les expliquer.

### Cours

Le premier cours a présenté les données épidémiologiques concernant ces biais de sexe, ainsi que les mécanismes génétiques classiques liés au chromosome X (différence de dosage du chromosome X, inactivation du X chez la femme et ses

conséquences). Puis ont été abordés les aspects spécifiques du retard mental (ratio M/F d'atteints masculins sur atteints féminins de 1,3-1,4) et ceux, d'analyse plus récente, de l'autisme (ratio M/F de 4, et même de 6 pour les cas d'autisme dits de haut niveau ou sans déficience cognitive). Après avoir présenté l'évolution des idées au XX<sup>e</sup> siècle, depuis les travaux de Penrose suggérant un biais social à la reconnaissance de formes de retard mental liées au chromosome X, j'ai présenté les données montrant que de telles formes monogéniques liées au X ne peuvent expliquer au plus qu'un tiers de l'excès de garçons avec retard mental, et ne peuvent rendre compte du ratio M/F de 4 dans l'autisme. Les cas particuliers de maladies liées au X ne touchant que les filles ont été présentés : pour le syndrome de Rett, un double effet rend compte de cette spécificité, car les mêmes mutations du gène MECP2 sont responsables d'une symptomatologie encore plus sévère chez les garçons (encéphalopathie néonatale) et, d'autre part, les mutations survenant préférentiellement dans la lignée germinale mâle, sont transmises aux filles. Les mécanismes particuliers des relations entre sexe et expression clinique ont été discutés pour le syndrome de résistance aux androgènes (mutations inactivant le gène du récepteur aux androgènes), et pour le cas très curieux de l'épilepsie spécifiquement féminine liée aux mutations du gène PCDH19 (également sur le chromosome X). La fin du 2<sup>e</sup> cours a été consacrée à d'autres mécanismes de type épigénétique : échappement partiel de certains gènes du X au phénomène d'inactivation chez la femme, arguments en faveur de phénomènes d'empreinte parentale, effets épigénétiques du dosage différentiel des chromosomes sexuels sur l'expression de gènes autosomiques (travaux notamment de H. Willard, C. Dulac, R. Festenstein).

Le 3<sup>e</sup> cours a porté plus spécifiquement sur les travaux cherchant à expliquer les biais de sexe, en général inverses, pour les maladies auto-immunes, avec par exemple le lupus où le rapport femmes/hommes atteints est d'environ 9. Divers travaux ont mis en évidence le rôle des hormones sexuelles, mais également, dans des modèles de souris très originaux (découplant le dosage des chromosomes sexuels et le sexe gonadique), de l'effet des chromosomes sexuels indépendants d'effets hormonaux. Enfin, le dernier cours de cette série a été consacré à la discussion des mécanismes pouvant expliquer des dimorphismes sexuels d'expression génétique dans le cerveau de mammifères, et des différences comportementales, notamment par imprégnation androgénique du cerveau masculin lors du développement prénatal ou néonatal. Ces mécanismes pourraient être impliqués dans la plus grande fréquence d'autisme chez les garçons (hypothèses de S. Baron-Cohen).

### **Colloque : Biais de sexe et maladies : quels mécanismes génétiques**

Le colloque d'une journée, le 23 novembre 2011, intitulé « Biais de sexe et maladies : quels mécanismes génétiques », fut suivi par une assistance nombreuse et attentive. La conférence introductive « Sex battles in the brain : genomic imprinting in the developing and adult central nervous system » fut donnée par Catherine Dulac (Harvard University), qui rapporta ses derniers travaux, dont certains non encore publiés, sur l'importance et la complexité des phénomènes d'empreinte parentale dans l'expression différentielle de nombreux gènes dans des régions spécifiques du cerveau de souris, et pouvant générer, pour certains gènes, un dimorphisme sexuel d'expression. Ses travaux suggèrent une influence maternelle notable dans le cerveau embryonnaire, et un biais paternel dans le cerveau adulte, notamment dans le cortex

et l'hypothalamus (voir Gregg *et al.*, 2010, *Science*, 329, 643 et 682). Les 3 conférences suivantes portèrent sur des mécanismes généraux pouvant générer des différences d'expression génétique en fonction du sexe : François Tronche (UPMC, Paris), « Contrôle of gene expression and sex differences : genetic dissection of glucocorticoid and androgen receptors functions » ; Claire Rougeulle (U. Paris-Diderot) sur l'inactivation de chromosome X et ses conséquences sur les pathologies humaines ; Richard Festenstein (MRC Clinical Sciences Centre, Londres), « Sex chromosome complement effects independent of phenotypic sex determine autosomal gene expression differences ». Les données épidémiologiques, mécanistiques ou les hypothèses concernant les biais de sexe dans les maladies neurodéveloppementales furent l'objet des conférences de Thomas Bourgeron (Institut Pasteur) : « The male and female synapses in autism spectrum disorders » ; Stanislas Lyonnet (Fondation Imagine, U. Paris-Descartes) : « A multifactorial mechanism of parent-of-origin effect in Hirschsprung disease » ; Jean-Louis Mandel : « Sex bias in intellectual deficiency : historical perspectives and current hypotheses » ; Jean-Pierre Hardelin (Institut Pasteur) : « Hétérogénéité génétique et biais de sex-ratio dans le syndrome de Kallmann » ; Christel Depienne (GH Pitié-Salpêtrière et UPMC) : « Mutations du gène PCHD19, une cause d'épilepsie limitée aux filles. Biais de sexe dans le syndrome de Gilles de la Tourette ». D'autres maladies neurodégénératives furent abordées par Philippe Corcia (CHRU Tours et U. François Rabelais) sur la sclérose latérale amyotrophique, Michael Schumacher (U. Paris Sud) : « Hormones stéroïdes et dimorphisme sexuel de la myéline ». Les 2 dernières conférences portèrent sur les maladies auto-immunes. Elles furent données par Sonia Berrih-Aknin (GH Pitié Salpêtrière, UPMC) : « AIRE : a key factor in gender-biased autoimmune disorders » et Yannick Allanore (Hopital Cochin, U. Paris Descartes) : « Biais de sexe dans le lupus et la sclérodermie systémique ».

#### COURS ET TABLE-RONDE : IMPACT DES MÉTHODOLOGIES DE GÉNOMIQUE À HAUT DÉBIT

##### **Actualités récentes en génétique de l'autisme et de la déficience intellectuelle**

Deux cours ont été consacrés, le 7 mars, aux actualités récentes en génétique de l'autisme et de la déficience intellectuelle, et notamment à l'accumulation de données par l'utilisation des méthodologies de génomique (détection de *Copy Number Variants*/CNV par puces ADN de type CGH array) et de séquençage à haut débit. Après une introduction sur les aspects épidémiologiques et l'augmentation apparente très étonnante de la fréquence de l'autisme, j'ai détaillé l'extraordinaire complexité génétique, indiquée par les résultats les plus récents, de ces deux pathologies neurodéveloppementales qui se recouvrent en partie. Ceux-ci mettent en évidence le très grand nombre de gènes (plusieurs centaines) qui paraissent impliqués dans des formes dites « monogéniques », l'importance des mutations « *de novo* » révélées par les analyses en CGH array pour les CNV et par les analyses d'exome (séquençage des régions codantes de plus de 20 000 gènes) dans des trios parents-enfant atteint. La liste des gènes identifiés s'allonge rapidement, montrant des recouvrements entre retard mental et autisme, mais de manière plus inattendue, avec

des gènes retrouvés mutés dans certains cas (encore peu nombreux) de schizophrénie. Les données suggèrent une causalité plus complexe (*double hit*, travaux de Evan Eichler) pour certaines CNV (et probablement aussi pour des mutations ponctuelles). Une excellente illustration de mécanismes possibles est fournie par le *syndrome TAR* (*thrombocytopenia-absent radius*) où la pathologie est générée par la combinaison d'une délétion récurrente d'une région du chromosome 1 (1q21.1) incluant le gène *RMB8A* sur un allèle, et la présence de variants rares (présents à une fréquence de 0,5-3 % dans la population), sur l'allèle non délété, diminuant l'expression en cis du gène *RMB8A*. Une découverte particulièrement fascinante est celle des délétions et duplications récurrentes en 16p11.2, initialement détectées dans des cohortes de patients avec autisme ou schizophrénie, et responsables de troubles neuro-développementaux fréquemment associés à une obésité qui peut être morbide dans le cas de la délétion, et à des troubles alimentaires de type anorexie, avec risque de sous-poids pathologique, pour la duplication (travaux de S. Jacquemont, J. Beckmann et P. Froguel). Si l'exemple du syndrome de retard mental avec X fragile montre que l'on peut passer (en près de 20 ans dans ce cas) de l'identification du gène muté à des essais thérapeutiques basés sur les hypothèses fonctionnelles validées par les études expérimentales sur des organismes modèles, l'hétérogénéité extrême des causes génétiques rendra très difficile l'extension de ce modèle à des causes individuellement beaucoup plus rares de déficience intellectuelle ou d'autisme. J'ai proposé que des formes de réseaux sociaux spécifiques puissent être utilisées pour constituer les bases de données génotype/phénotype qui seront nécessaires pour passer de l'identification diagnostique de mutations à des prises en charge médicales adaptées à la nature du gène muté.

### **Impact des méthodologies de séquençage à haut débit sur le diagnostic prénatal et le diagnostic préconceptionnel : nouvelles applications, nouveaux problèmes soulevés**

Les deux cours du 14 mars et une table ronde exceptionnelle le 21 mars ont porté sur les nouvelles applications en cours ou proposées du séquençage à très haut débit pour le diagnostic de maladies génétiquement très hétérogènes (exemple du syndrome de Bardet-Biedl), pour le diagnostic prénatal non invasif des trisomies 21 et 13 (et potentiellement d'autres mutations pathologiques) (travaux de Lo à Hong-Kong, repris notamment par la société Sequenom), et enfin par les possibilités de diagnostic préconceptionnel des couples à risque (risquant d'avoir des enfants atteints de maladies génétiques pédiatriques graves – maladies autosomiques récessives ou liées au X), par dépistage dans la population générale. Après avoir présenté les aspects techniques, j'ai évoqué les aspects de santé publique et les problèmes éthiques potentiellement soulevés, ces derniers ayant fait l'objet principal de la table ronde du 21 mars. J'ai notamment rappelé les actions de dépistage préconceptionnel (couples à risque) menées depuis de nombreuses années dans des pays méditerranéens pour les thalassémies, et dans les populations juives en Israël et en Amérique du Nord, pour des maladies récessives particulièrement fréquentes dans ces populations. Un tel dépistage est proposé assez systématiquement dans la population, aux États-Unis et en Israël, pour des pathologies génétiques relativement fréquentes telles que la mucoviscidose et l'amyotrophie spinale. En France, ces stratégies ne sont pas proposées, et pas même discutées.

L'objet de la table ronde, co-organisée avec le Dr. Catherine Bourgain (INSERM/U. Paris Sud, U 669) fut d'explorer les problèmes de santé publique et les aspects éthiques de ces applications du séquençage à haut débit, qui représentent par ailleurs un marché économique considérable. La table ronde s'est ouverte par un hommage au Prof. André Boué, décédé le 27 février 2012, qui fut, avec son épouse Joëlle Boué, un pionnier de l'étude des aberrations chromosomiques et de leur diagnostic prénatal. Une discussion très riche, pendant près de 3 heures, a permis d'aborder sans les épuiser de nombreux aspects des problèmes soulevés par les perspectives de nouvelles applications diagnostiques en génétique, vus par des professionnels de la santé, des représentants d'associations de malades, mais aussi un historien des sciences et un parlementaire, vice-président de l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Ceci a fait apparaître des convergences, le diagnostic non invasif de la trisomie 21 n'étant pas considéré comme un nouveau problème éthique, mais posant le problème de la mise en place et des aspects d'économie de la santé, alors que les opinions sur le développement du diagnostic préconceptionnel étaient beaucoup plus contrastées, entre la description des pratiques en Israël et les réticences de plusieurs participants français. Les participants à cette table ronde étaient (par ordre alphabétique) : Ségolène Aymé, médecin généticienne et épidémiologiste, fondatrice et ancienne directrice d'Orphanet, membre du comité de suivi du Plan national Maladies rares ; Alexandra Benachi, chef du service de gynécologie, obstétrique et médecine de la reproduction, hôpital Antoine Beclère ; Dominique Bonneau, PU-PH de génétique médicale, CHU d'Angers, ancien président de la fédération française de génétique humaine et médicale ; Jean-Paul Bonnefont, MCU-PH, responsable du laboratoire hospitalier de génétique moléculaire, hôpital Necker-Enfants malades ; Jean-Paul Gaudillière, historien travaillant sur les rapports sciences, médecine et industrie, directeur de recherche à l'Inserm, directeur du Cermes 3 ; Patrick Gaudray, directeur de recherche au CNRS, U. François Rabelais de Tours, membre du Comité consultatif national d'éthique ; Françoise Kbayaa, secrétaire générale de l'UNAPEI ; Jean-Yves Le Déaut, député de Meurthe-et-Moselle, ancien professeur de biochimie et biologie moléculaire à l'université de Nancy, vice-président de la région Lorraine, vice-président de l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques ; Marie-Christine Ouillade, membre du conseil d'administration de l'AFM et de Généthon, membre du conseil d'orientation de l'Agence de la biomédecine ; Annick Raas-Rotschild, *Professor and senior pediatrician medical geneticist*, Department of Genetics and Metabolic Diseases, Hadassah Medical Center, Jerusalem ; Brigitte Simon-Bouy, Génétique constitutionnelle prénatale et post-natale, Centre hospitalier de Versailles. Étaient également présents dans la salle : Arnold Munnich, professeur de génétique à l'université Paris-Descartes, Viviane Viollet, fondatrice et ancienne présidente de l'Association nationale du Syndrome X fragile, présidente de l'Alliance maladies rares, Christel Nourissier, secrétaire générale d'Eurordis (*Rare Diseases Europe*) et présidente de l'Association Prader-Willi France, Yann Le Cam, *Chief Executive Officer*, Eurordis, Henri Bléhaut, médecin, responsable des programmes de recherche à la Fondation Jérôme Lejeune, Paulette Morin, déléguée régionale Alliance maladies rares, présidente d'honneur de l'Association française des syndromes de Marfan et apparentés.

### Autres cours

« Des maladies monogéniques aux maladies génétiquement complexes : quelques perspectives » (1 h), École d'automne 2011 de l'Institut du Thorax, Nantes, *Troubles métaboliques et risque cardiovasculaire* (6 octobre 2011).

« Génétique multifactorielle des maladies communes » (4 h), master de physiopathologie cellulaire et moléculaire, module de génétique humaine à l'université de Strasbourg (26 octobre 2011).

« Whole genome and exome sequencing in human genetics » (2 h), *IGBMC International PhD Programme* (15 février 2012).

### RECHERCHE

Le groupe de recherche en génétique humaine fait partie du département de médecine translationnelle et neurogénétique de l'IGBMC (Institut de génétique et biologie moléculaire et cellulaire, UMR 7104 du CNRS, Inserm U 964 et université de Strasbourg). Il se consacre à l'étude des mécanismes génétiques et physiopathologiques de maladies monogéniques neurologiques ou musculaires. Des aspects de recherche clinique sont développés avec le laboratoire de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg, dirigé par J.-L. Mandel.

#### Liste des équipes et thématiques

1a) Fonction de la protéine FMRP, déficiente dans le syndrome de retard mental avec X fragile (JLM, avec Hervé Moine, DR2 CNRS). Nouvelles approches visant à expliquer le biais de sexe dans le retard mental avec ou sans autisme (JLM, avec Amélie Piton) ;

1b) Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl (JLM, avec Jean Muller, MCU-PH et en collaboration avec le Prof. H. Dollfus) et d'autres pathologies génétiquement hétérogènes ;

2) Mécanismes du syndrome de Coffin-Lowry (retard mental syndromique lié au chromosome X) impliquant la protéine kinase RSK2 (André Hanauer, MCU) ;

3) Mécanismes des maladies neuromusculaires : myopathies myotubulaires et centronucléaires et remodelage membranaire dans le muscle (Jocelyn Laporte, DR1 Inserm) ;

4) Nicolas Charlet-Berguerand (DR2 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. Il est lauréat en 2012 d'un *ERC starting grant* du Conseil européen de la recherche ;

5) 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 ;

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

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

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

(Avec Hervé Moine, DR2 CNRS)

Le syndrome X-fragile représente la forme la plus fréquente de retard mental monogénique. Ce syndrome résulte d'une expansion instable de répétitions CGG dans le gène *FMR1*, entraînant sa répression transcriptionnelle. *FMR1* code pour la protéine FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) qui lie des ARN messagers cibles au sein de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes. De nombreux travaux suggèrent un rôle de FMRP dans le métabolisme des ARNm neuronaux, notamment dans le transport dendritique et la traduction localisée d'ARNm importants pour la plasticité synaptique sous contrôle de la voie de signalisation des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1 et mGluR5). Cependant, le rôle précis de FMRP reste mal compris. Afin de caractériser la fonction de FMRP, nous avons entrepris 1) d'identifier des cibles ARNm de FMRP pouvant expliquer les phénotypes de la maladie et 2) de caractériser l'action exacte de FMRP sur ces cibles en utilisant un modèle murin du syndrome de l'X fragile.

Nous avons montré antérieurement que FMRP se lie *in vitro* de manière spécifique et avec une forte affinité aux ARNm contenant un motif structural de type « G(uanine)-quadruplex » (Schaeffer *et al.*, 2001 ; Castet *et al.*, 2005) et contribue à la formation de granules d'ARN en conditions de stress cellulaire (Didiot *et al.*, 2009). En collaboration avec l'équipe de Barbara Bardoni (CNRS, Sophia-Antipolis), nous avons montré que FMRP peut également interagir avec un autre type de motif d'ARN en tige-boucle (SoSlip) (Bechara *et al.*, 2009). Le motif G-quadruplex semble toutefois le plus fréquemment retrouvé parmi les cibles potentielles de FMRP. Nous avons identifié la présence d'un consensus G-quadruplex dans la région 3' non traduite d'une proportion importante des ARNm neuronaux localisés dans les dendrites et avons confirmé la présence de cette structure dans les ARNm de deux protéines essentielles pour l'activité synaptique, CaMKIIa et PSD95 (Subramanian *et al.*, 2011). Nous avons montré que le motif G-quadruplex est nécessaire et suffisant pour l'adressage au niveau des dendrites des ARNm CaMKIIa et PSD95, et cette activité est modulée par l'activation des récepteurs au glutamate mGluR5. Le motif G-quadruplex représente donc un nouveau type de signal d'adressage des ARNm vers les dendrites. FMRP ne semble cependant pas être essentiel au transport basal des ARNm mais contribuerait à la régulation du transport de manière mGluR-dépendante (montré pour CaMKIIa).

L'utilisation d'une approche CLIP (*cross linking immunoprecipitation*) sur des cultures de neurones murins nous a permis de montrer *in cellulo* que des ARNm pourvus d'un motif G-quadruplex sont plus efficacement liés par FMRP et la dépolarisation des neurones par le KCl module certaines de ces interactions (Tabet *et al.*, non publié). Une étude visant à identifier l'ensemble des ARNm neuronaux les plus touchés par l'absence de FMRP est en cours. En parallèle, pour comprendre l'impact direct de FMRP sur le métabolisme de ses ARNm cibles, une approche dite de « *tethering* » a été entreprise, où FMRP est forcé à lier de manière unique un ARNm rapporteur. Cette approche révèle que FMRP induit la localisation de ses ARNm cibles dans des granules d'ARN distincts des granules de stress et des *processing bodies* (Tabet *et al.*, non publié). La caractérisation fonctionnelle de ces granules est en cours.

Deux nouvelles approches visant à tester des hypothèses pouvant expliquer le biais de sexe observé dans le retard mental et dans l'autisme (plus fréquents chez les garçons) ont été initiées en 2011 (avec Amélie Piton, boursière postdoctorale FRM). Nous explorons les gènes cibles, dans des neuroblastes ou neurones humains, de la régulation transcriptionnelle par les androgènes et le récepteur aux androgènes (projet financé par l'ANR). Les cellules utilisées sont issues de la différenciation de cellules souches embryonnaires (collaboration avec le laboratoire du Pr. Marc Pechanski, iSTEM Évry). Nous testons également le rôle potentiel dans le biais de sexe de variants rares (faux-sens) présents dans les 90 à 100 gènes du chromosome X impliqués dans des formes monogéniques de retard mental (financement de la Fondation Jérôme Lejeune).

Nous avons, au cours de l'année 2012, développé une stratégie de capture et séquençage des exons de 220 gènes (dont près de cent portés par le chromosome X), antérieurement identifiés dans des formes de déficience intellectuelle, avec ou sans autisme (financement partiel par contrat de l'Agence de biomédecine). Des résultats très prometteurs ont été obtenus pour les 50 premiers patients analysés. Cette stratégie a donc vocation à être transférée dans le cadre du laboratoire de diagnostic génétique du CHU de Strasbourg, courant 2013.

### **1b) Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl et d'autres pathologies génétiquement hétérogènes**

(Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl : avec J. Muller, en collaboration avec le Prof. H. Dollfus)

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), de transmission autosomique récessive, associe rétinite pigmentaire, obésité, polydactylie, anomalies rénales et atteinte cognitive. Il est caractérisé par une étonnante hétérogénéité génétique, contrastant avec la spécificité de la présentation clinique. De 2000 à 2011, 16 gènes (*BBS1* à *BBS16*) ont été identifiés, dont les mutations rendent compte d'environ 70 % des patients. L'identification de ces gènes a permis de relier le syndrome BBS à des défauts dans 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*, à rechercher des corrélations génotype/phénotype éventuelles, étudier l'épidémiologie moléculaire du syndrome et développer des applications au diagnostic et au conseil génétique. Cette étude a permis d'identifier deux gènes (*BBS10* et *BBS12*) particulièrement importants car mutés chez plus de 25 % des patients (Stoetzel *et al.*, 2006, 2007 ; Muller *et al.*, 2010). Les gènes *BBS10* et *BBS12* codent pour des protéines spécifiques des vertébrés, dont la séquence protéique évolue rapidement, et qui appartiennent, comme *BBS6*, à la superfamille des chaperonines de type II (Stoetzel *et al.*, 2007). Un complexe contenant les protéines *BBS6*, *BBS10* et *BBS12* a été récemment identifié, qui joue un rôle dans l'assemblage du BBSome, un complexe contenant 7 autres protéines *BBS* (Seo *et al.*, 2010). Alors qu'aucune différence phénotypique claire ne permet de différencier les patients porteurs de mutations dans l'un des gènes *BBS*, nous avons contribué à montrer que les mutations dans le gène *SDCCAG8/NPHP10/BBS16* sont associées à un phénotype BBS distinct, avec absence de polydactylie et présence constante d'une insuffisance rénale précoce (Schaefer *et al.*, 2011).

Nous avons mis au point des approches de diagnostic moléculaire s'appuyant notamment, dans les familles consanguines, sur la cartographie d'homozygotie (Muller *et al.*, 2010). La recherche de mutations dans les 16 gènes *BBS* pour le diagnostic ou l'épidémiologie moléculaire étant très lourde par les techniques de séquençage classique, nous avons mis au point une approche très puissante basée sur la capture ciblée d'exons de 30 gènes (gènes *BBS* et de ciliopathies cliniquement ressemblantes, telles que le syndrome d'Alström ou la néphronoptise) couplée au séquençage à très haut débit. Nous avons validé cette approche sur 14 patients avec mutations connues, et l'avons appliquée à 38 patients dont la nature des mutations n'avait pas été déterminée. Cette stratégie a permis d'identifier les mutations causales chez près de 70 % des patients avec symptomatologie BBS suspectée cliniquement. Nous avons montré également que cette méthodologie permet de détecter des délétions hétérozygotes d'exons, ce que ne permet pas le séquençage classique. Nos résultats ont montré que la probabilité de détecter les mutations est corrélée avec le nombre de signes cliniques du syndrome BBS présentés par les patients, et suggèrent que très peu de gènes de syndrome BBS « classique » restent à identifier (Redin *et al.*, 2012). Dans 3 des patients qui avaient été référés pour suspicion de syndrome BBS, nous avons retrouvé en fait des mutations du gène *ALMS1* responsable du syndrome d'Alström, une ciliopathie présentant certaines similarités avec BBS. Ce gène codant pour une très grande protéine n'était pas proposé en France pour les recherches de mutations à visée diagnostique ; ainsi a pu être illustré l'intérêt de la stratégie développée (Redin *et al.*, 2012).

Nous avons aussi contribué à des études ayant permis l'identification d'un gène responsable d'une anomalie de développement dentaire, le gène *Smoc2* (Bloch-Zupan *et al.*, 2011), l'identification du transporteur mitochondrial du pyruvate (Bricker *et al.*, 2012), et à montrer que des délétions récurrentes dans le gène *DPY19L2* par recombinaison homologue non-allélique sont la principale cause de globozoospermie, une anomalie de la spermatogenèse responsable d'infertilité autosomique récessive (Elinati *et al.*, 2012).

## 2) Syndrome de Coffin-Lowry et kinase RSK2

(André Hanauer)

L'équipe étudie les mécanismes physiopathologiques pouvant être responsables des déficits cognitifs dans le syndrome de Coffin-Lowry. Les mutations perte de fonction dans le gène *RPS6KA3* lié au chromosome X, codant pour la protéine kinase RSK2, sont responsables de ce syndrome. Des souris invalidées pour le gène *RSK2* ont été créées précédemment par l'équipe. Des souris invalidées pour le gène paralogue *RSK3* également créées par l'équipe d'André Hanauer ont permis très récemment de démontrer un rôle de ce gène dans l'hypertrophie des myocytes cardiaques en réponse à un stress cardiaque chronique (Li *et al.*, 2012).

Une étude transcriptomique d'hippocampe de souris invalidées pour *RSK2* a révélé des altérations d'expression significatives de 100 gènes. Trois quarts de ces gènes montrent une expression augmentée chez les souris KO-*RSK2* et le quart restant une expression diminuée. Nous avons plus particulièrement étudié les mécanismes liés à certains de ces gènes pouvant être impliqués dans l'activité synaptique. Nous avons montré que le niveau d'activation des kinases ERK1/2 était anormalement élevé dans l'hippocampe des souris KO-*mrsk2*. Des études basées sur des cultures primaires de

neurones d'hippocampe ont par la suite montré que le glutamate activait les kinases ERK1/2 et RSK2, et confirmé la plus forte activation de ERK1/2 dans les neurones *mrsk2* KO. Nos données montraient que, dans les conditions normales, RSK2 exerce une rétro-inhibition sur la voie ERK1/2, et que cette rétro-inhibition est absente dans les cellules n'exprimant pas RSK2. En outre, les facteurs de transcription CREB et Elk1, deux cibles nucléaires de ERK1/2, ont aussi un niveau d'activation anormalement élevé dans les neurones déficients en RSK2. Finalement, l'induction après stimulation par du glutamate de *c-Fos*, *Zif268* et *Arc*, 3 gènes immédiats précoces régulés par ces facteurs de transcription, était significativement plus importante dans les neurones *mrsk2* KO. Cette altération de la signalisation par ERK1/2, due à l'absence de RSK2, est susceptible d'influencer des fonctions neuronales, et donc de jouer un rôle dans le dysfonctionnement cognitif chez les souris *mrsk2* KO et dans le syndrome de Coffin-Lowry (Schneider *et al.*, 2011).

Le haut niveau d'expression de RSK2 dans l'habenula de souris nous a conduit à rechercher des fonctions particulières de RSK2 dans cette structure cérébrale, en étroite collaboration avec l'équipe de Brigitte Kieffer (IGBMC). Ces travaux ont montré que les souris *Rsk2*-KO étaient incapables d'associer un contexte spécifique à un stimulus aversif, indiquant un rôle de RSK2 dans l'aversion de place conditionnée (Darcq *et al.*, 2011). D'autre part, l'analgésie aigüe induite par la morphine est également altérée chez ces souris, indiquant un rôle de RSK2 dans la réponse nociceptive (Darcq *et al.*, 2012). L'injection par stéréotaxie de virus AAV exprimant un siRNA ciblant RSK2 nous a permis de montrer que l'habenula médian jouait un rôle essentiel dans ces deux dysfonctions (Darcq *et al.*, 2011, 2012).

### **3) Pathophysiologie des maladies neuromusculaires : myopathies congénitales à centralisation des noyaux**

(Équipe dirigée par Jocelyn Laporte)

Nous étudions les mécanismes pathologiques et les gènes impliqués dans des myopathies congénitales très sévères et handicapantes. Nous nous concentrons sur les myopathies centronucléaires et myotubulaires pour l'étude des mécanismes cellulaires et physiologiques, pour lesquelles nous validons des modèles animaux afin de caractériser les mécanismes pathologiques et de tester des approches thérapeutiques.

Les myopathies centronucléaires (CNM), caractérisées par une grande proportion de fibres musculaires atrophiques à noyaux centraux (les noyaux étant normalement périphériques dans les fibres musculaires matures) sont dues à des mutations de protéines impliquées dans le remodelage et le trafic des membranes: la phosphatase à phosphoinositides myotubulaire (MTM1) est mutée dans la forme liée au chromosome X (aussi appelée myopathie myotubulaire), l'amphiphysine 2 (BIN1) est mutée dans des formes autosomiques récessives, et la GTPase dynamine 2 (DNM2) est impliquée dans la forme autosomique dominante.

#### *Diagnostic moléculaire et bases génétiques des myopathies*

La moitié des patients atteints de maladies neuromusculaires n'ont pas de diagnostic génétique. Afin de faciliter ce diagnostic, nous avons récemment apporté la preuve de principe que le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet d'accélérer la

découverte de la mutation causale et ce à moindre coût (Vasli *et al.*, 2012a). Ce protocole est en cours de transfert au laboratoire de diagnostic génétique (V Biancalana). Nous avons aussi rapporté une mutation d'épissage provoquant des anomalies complexes de l'épissage de plusieurs exons dans le gène MTM1 et causant la myopathie myotubulaire (Vasli *et al.*, 2012b). Enfin, la publication d'une revue et d'un arbre décisionnel pour le diagnostic des myopathies centronucléaires devrait clarifier et faciliter leur diagnostic par les différents laboratoires (Biancalana *et al.*, 2012).

L'identification d'un nombre important de mutations de DNM2 chez des patients atteints de CNM dominant ou sporadique nous a permis d'établir des corrélations génotype-phénotype et d'identifier des mutations préférentiellement associées à des formes plus sévères. Ce travail met aussi en évidence une hétérogénéité phénotypique intra- et inter-familiale pour certaines mutations (Bohm *et al.*, 2012a).

Nous utilisons l'approche de séquençage de nouvelle génération afin d'identifier les causes génétiques de myopathies encore non caractérisées moléculairement. Grâce au séquençage d'exome d'une famille samaritaine avec une myopathie congénitale d'apparente ségrégation dominante, nous avons identifié une mutation homozygote du récepteur à la ryanodine (RYR1) comme la cause de cette maladie (Bohm *et al.*, 2012b). La pseudo-dominance était due à la grande consanguinité de cette population. Comme il s'agit de la seule myopathie congénitale sévère qui s'améliore au cours du temps jusqu'à un stade bénin chez l'adulte, ce travail contribuera peut-être à identifier des stratégies thérapeutiques pour d'autres patients atteints de myopathies sévères avec mutation RYR1.

#### *Fonctions cellulaires impliquées dans les myopathies centronucléaires*

La dynamine 2 est non seulement mutée dans la forme dominante de CNM mais aussi dans une forme dominante de neuropathie périphérique de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Des mutations différentes dans le même gène causent donc deux maladies touchant des tissus différents. Afin de mieux comprendre si l'altération de différentes fonctions de la dynamine est à la base de cette différence phénotypique, nous avons comparé des mutations CNM et CMT dans différents tests cellulaires. Contrairement aux mutations CMT, les mutations CNM induisent une perte d'association avec les microtubules. Par contre, les mutations CMT semblent avoir un impact sur l'organisation des vésicules d'endocytose. Mais la majorité des fonctions de la dynamine ne sont pas affectées, ce qui suggère que ces phénotypes pathologiques sont dus à des défauts n'affectant que quelques fonctions précises de la dynamine (Koutsopoulos *et al.*, 2011).

#### *Modèles animaux des myopathies centronucléaires et approches thérapeutiques*

Nous caractérisons des modèles murins de myopathies centronucléaires. Nous avons précédemment montré dans une souris MTM1-KO et chez des patients avec différentes formes de CNM que la structure membranaire des triades était affectée. Les triades sont formées par la connexion entre le réticulum sarcoplasmique et le tubule T et participent à la régulation calcique. Nous avons plus récemment montré que la phosphatase à phosphoinositides Jumpy/MTR14, qui possède la même spécificité de substrat que la myotubularine MTM1, est elle aussi importante pour la structure des triades, ce qui incite à penser que les phosphoinositides régulés par

MTM1 et MTMR14 sont importants pour le positionnement et le remodelage des triades (Hnia *et al.*, 2012).

La caractérisation de modèles murins BIN1 et DNM2 est en cours et des résultats préliminaires suggèrent que l'amphiphysine et la dynamine sont essentielles à la maturation terminale du muscle squelettique chez la souris.

L'injection de virus AAV (*adeno-associated virus*) exprimant la myotubularine permet d'améliorer le phénotype des souris MTM1-KO, qui présentent une histologie très similaire à celle des patients. De façon inattendue, un mutant de MTM1 sans activité phosphatase permet une amélioration de la majorité des signes de la maladie y compris de la force musculaire, sans régulariser le niveau de phosphorylation des phosphoinositides (Amoasii *et al.*, 2012). Cela suggère que plusieurs fonctions musculaires de la myotubularine ne sont pas dépendantes de son activité enzymatique. Ceci peut avoir un impact sur les stratégies thérapeutiques visant à régulariser le niveau des phosphoinositides et, de façon plus générale, incite à la prudence quand l'analyse de mutant KO est utilisée pour tirer des conclusions sur le rôle de l'activité de certaines enzymes.

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

(Nicolas Charlet-Berguerand)

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

1) Les dystrophies myotoniques (DM) sont les formes adultes les plus communes de dystrophies musculaires. Ces maladies génétiques sont causées soit par des expansions de répétitions des nucléotides CTG dans la partie 3'UTR du gène DMPK (cause de la dystrophie myotonique de type 1, DM1), soit par l'expansion de répétitions des nucléotides CCTG dans le premier intron du gène ZNF9 (donnant lieu à la dystrophie myotonique de type 2, DM2). Dans ces deux cas, les répétitions CTG ou CCTG sont transcrites et s'accumulent sous forme d'ARN mutés contenant de longues répétitions des nucléotides CUG (DM1) ou CCUG (DM2). Il est maintenant clairement établi que ces ARN sont pathogéniques par un mécanisme de titration d'une protéine liant les ARN de type CUG et CCUG, la protéine Muscleblind (MBNL1). En effet, l'inactivation du gène *Mbnl1* chez la souris reproduit les symptômes des dystrophies myotoniques. Nous avons montré antérieurement que MBNL1 est un facteur d'épissage et que sa séquestration chez les patients atteints de dystrophie myotonique conduisait à des altérations de l'épissage alternatif d'ARN pré-messager spécifiques (Ho *et al.*, 2004). Ainsi, l'altération de la régulation de l'épissage du canal chlore musculaire *CLCN1* chez les patients DM conduit à une myotonie, expliquant ainsi l'un des symptômes cardinaux de ces maladies (Charlet *et al.*, 2002).

Suite à ces travaux, notre principal objectif était d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine des autres symptômes observés chez les patients atteints de dystrophie myotonique. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux altérations d'épissage qui pourraient expliquer les symptômes de faiblesse musculaire et d'arythmie cardiaque.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Jocelyn Laporte (IGBMC), nous avons mis en évidence une altération spécifique de l'épissage des transcrits BIN1 chez les patients DM. Nous avons montré que cet épissage est régulé directement par la protéine MBNL1 et qu'il altère la fonction normale de la protéine BIN1. Enfin, des souris reproduisant cette altération de l'épissage de BIN1 développent une faiblesse musculaire évoquant celle observée chez les patients DM. Ce travail nous a ainsi permis d'identifier une cause moléculaire de la faiblesse musculaire chez les patients DM (Fugier *et al.*, 2011).

Dans un deuxième temps, nous avons identifié une altération spécifique de la maturation du micro-ARN miR-1 dans des échantillons de cœur de patients DM1. Nous avons alors montré que MBNL1, en plus d'un facteur d'épissage, est aussi un facteur impliqué dans la maturation des pré-microARN. Cette altération de miR-1 pourrait expliquer en partie les troubles de la conduction cardiaque observée chez les patients atteints de dystrophie myotonique (Rau *et al.*, 2011).

Nous poursuivons désormais ce travail sous deux axes :

(i) Nous venons d'identifier une altération de l'épissage alternatif du canal sodium cardiaque (SCN5A). Il s'agit d'une cible prometteuse car des mutations de ce gène sont responsables du syndrome de Brugada, caractérisé par des arythmies cardiaques fatales. Il est à noter que l'incidence du syndrome de Brugada est 200 fois supérieure chez les patients DM que dans la population normale. Nous souhaitons étudier les causes et conséquences de cette altération de SCN5A.

(ii) Nous avons identifié de nouvelles protéines se liant spécifiquement aux répétitions CCUG (cause de DM2) et non aux répétitions ARN CUG (cause de DM1). Il est important de noter que, pour des raisons encore inexpliquées, les patients DM2 présentent un tableau clinique moins sévère que les patients DM1. L'identification de protéines spécifiques des CCUG et des patients DM2 pourrait donc expliquer cette différence de sévérité des symptômes.

2) Le syndrome FXTAS est une maladie neuro-dégénérative de survenue tardive qui touche les parents ou grands-parents (surtout masculins) d'enfants atteints du syndrome de retard mental avec X fragile. Cette maladie génétique est due à l'accumulation d'un ARN messenger du gène FMR1 contenant entre 50 et 200 répétitions CGG (correspondant à la prémutation du gène, par rapport à la mutation complète causale du retard mental) qui séquestrent des protéines encore mal identifiées. Nous avons montré précédemment que les agrégats d'ARN contenant ces répétitions CGG séquestraient le facteur d'épissage SAM68 et conduisaient à des altérations spécifiques de l'épissage chez les patients atteints de FXTAS (Sellier *et al.*, 2010).

Nous avons complété cette étude, et nous montrons que les répétitions CGG sont toxiques par séquestration des protéines DROSHA et DGCR8. Ces protéines sont indispensables à la maturation des micro-ARNs et leur séquestration pourrait jouer un rôle important dans la neuro-dégénérescence observée chez les patients FXTAS (Sellier *et al.*, 2013).

Nos principaux projets portent sur la clarification des mécanismes moléculaires de FXTAS (collaboration avec Peter Todd, États-Unis), sur l'établissement de nouveaux modèles cellulaires pour FXTAS avec le développement de cellules iPS différenciées en neurones en collaboration avec les équipes de Stéphane Viville (IGBMC) et de Cécile Martinat (I-stem, Paris), sur de nouveaux modèles murins des dystrophies myotoniques basés sur des virus AAV exprimant des répétitions CUG ou CCUG (collaboration avec Denis Furling, Institut de myologie, Paris) et enfin sur la recherche

de molécules pouvant atténuer l'effet toxique des répétitions CUG ou CGG (collaboration avec Denis Furling et Matthew Disney, Scripps Institute, États-Unis).

### **5) Pathophysiologie des ataxies récessives liées à une dysfonction mitochondriale**

(Équipe dirigée par Hélène Puccio, DR2 Inserm)

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

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

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

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

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

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

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

## **6) Génétique moléculaire des ataxies récessives**

(Équipe M. Koenig)

Nous avons initié la recherche de nouveaux gènes d'ataxie par séquençage haut débit de l'exome de patients issus de famille consanguine avec plusieurs enfants atteints. Nous avons identifié une variation faux-sens d'un acide aminé hautement conservé dans la famille avec ataxie + épilepsie que nous avions précédemment décrite (Gribaa *et al.*, 2007). La mutation touche le gène *WFOX*, contenant un domaine WW et un domaine oxydo-réductase, et connu pour être un suppresseur de tumeur. Cependant, une mutation spontanée du domaine oxydase a été rapportée chez les rats *lde* (*lethal dwarfism and epilepsy*). Ces rats présentent également dans 95 % des cas une ataxie et représentent donc un modèle très similaire à la maladie affectant nos patients, bien qu'il soit plus sévère. Nous collaborons avec le Pr M. Aldaz (Texas), pour l'analyse fonctionnelle de la mutation et l'analyse de modèles de KO conditionnels du gène *WFOX* de la souris.

Depuis l'identification du gène de l'ataxie par déficit en coenzyme Q10 (ARCA2, gène *ADCK3*, Lagier-Tourenne *et al.*, 2008), nous avons identifié neuf nouveaux malades atteints de cette affection rare. L'étude du spectre clinique de ces patients montre qu'il s'agit d'une affection homogène, très lentement progressive, et associant une ataxie cérébelleuse pure à un retard mental léger à modéré et parfois à une épilepsie. Surtout, l'étude montre que la supplémentation en coenzyme Q10, bien que non curative, est bénéfique pour les patients et fait d'ARCA2 l'une des rares ataxies traitables (manuscrit en préparation).

Fort de notre contribution majeure à l'explosion des connaissances dans le domaine des ataxies récessives, nous avons publié un article de revue faisant le point sur le diagnostic clinique et différentiel de ces affections complexes et sur les mécanismes physiopathologiques en cause. L'identification d'un nombre croissant de gènes mutés montre que pratiquement n'importe quelle voie métabolique peut être altérée

de façon causale dans les ataxies récessives (altérations de la mitochondrie, du peroxyosome, du lysosome, des endosomes, du cytosquelette, des canaux ioniques, du métabolisme des lipides, de la transcription et de la réparation de l'ADN). Le point commun semble bien plus être le fait que ces voies métaboliques sont affectées de façon marginale, de manière à n'altérer que partiellement le fonctionnement du système nerveux central, dont les neurones sensitifs, spinocérébelleux et cérébelleux semblent être les plus sensibles (Anheim *et al.*, 2012).

## 7) Maladies à expansion de polyglutamine

(Yvon Trottier, avec F. Klein)

L'équipe étudie la physiopathologie de la maladie de Huntington (MH) et de l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7). Ces 2 maladies neurodégénératives à transmission dominante sont causées par des expansions de polyglutamine (polyQ), qui confèrent des propriétés toxiques aux protéines correspondant à chaque maladie. La toxicité des protéines mutées augmente avec la taille de la polyQ, et perturbe graduellement les mécanismes essentiels à la fonction et la survie des neurones, avec une spécificité d'atteinte neuronale qui diffère selon la maladie.

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

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

Cependant, au cours des dernières années, plusieurs études, incluant les nôtres, remettent en question l'hypothèse d'une conformation pathogénique. En effet, nous avons montré que les courtes et longues polyQ ont des propriétés structurales et physiques comparables *in vitro* (Klein *et al.*, 2007). Plus récemment, nous avons montré que l'expansion de polyQ en soi ne modifie pas les interactions de la huntingtine (la protéine impliquée dans la MH) avec ses partenaires ; c'est l'agrégation de la huntingtine mutée qui affecte fortement la localisation et la solubilité des partenaires (Davranche *et al.*, 2011).

Nous avons obtenu d'autres données structurales en défaveur de l'hypothèse conformationnelle. En effet, nous avons déterminé la structure cristalline de l'anticorps anti-polyglutamine 1C2 et comparé celle-ci à la structure d'un autre anti-polyQ, le MW1. Nous montrons que les structures des deux anticorps sont très similaires (Klein *et al.*, en préparation). Ces résultats s'ajoutent donc à d'autres propriétés communes aux deux anticorps, notamment la capacité de reconnaître préférentiellement les expansions de polyQ en effectuant des liaisons bivalentes. De plus, en se basant sur les données structurales du MW1 en interaction avec la polyQ, nous pouvons conclure que le 1C2 reconnaît un épitope polyglutaminé allongé non structuré.

Actuellement, l'hypothèse conformationnelle repose essentiellement sur les propriétés d'un autre anticorps anti-polyQ, le 3B5H10. En effet, l'équipe de S. Finkbeiner a publié plusieurs études corrélant le degré de toxicité des expansions

et leur détection par le 3B5H10, suggérant que cet anticorps diffère du 1C2 et MW1 et reconnaît une conformation toxique. En utilisant les données structurales du 3B5H10 récemment publiées, nous avons comparé les 3 anticorps. De façon étonnante, les 3 anticorps ont des structures ainsi que des séquences primaires exceptionnellement similaires. À la lumière de cette similitude, il est difficile de comprendre comment le 3B5H10 pourrait reconnaître un épitope conformationnel. Nos premières études biochimiques avec le 3B5H10 montrent qu'il détecte les courtes et les longues polyQ de façon comparable, confirmant qu'il ne reconnaît pas d'épitope conformationnel.

Dans l'ensemble, nos études et celles d'autres équipes infirment l'hypothèse conformationnelle, suggérant que la toxicité des expansions de polyQ repose sur d'autres facteurs, et probablement en premier lieu les propriétés d'agrégation corrélées avec la longueur de polyQ.

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

Nous avons récemment développé une nouvelle technologie nommée SynAggreg, qui permet de cribler à haut débit de façon automatisée des modulateurs d'agrégation de polyQ (Klein *et al.*, manuscrit en préparation). Cette technologie devrait être plus sensible que celles précédemment utilisées pour identifier des modulateurs d'agrégation à partir de criblage de banques de composés chimiques. De plus, SynAggreg va nous permettre d'étudier des combinaisons de modulateurs d'agrégation pour identifier celles qui agissent de façon synergique pour prévenir la formation d'agrégats toxiques ou stimuler la formation d'agrégats non-toxiques. En effet, nous comptons développer une nouvelle approche thérapeutique pour la MH en utilisant ces combinaisons synergiques à faibles doses pour obtenir de meilleurs effets bénéfiques sur la pathologie tout en prévenant les effets toxiques secondaires des molécules.

*SynAggreg* pourrait aussi représenter un outil de choix pour tester des combinaisons de molécules préalablement identifiées contre les amyloïdes impliqués dans d'autres protéinopathies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Dans le but de valoriser SynAggreg, nous avons obtenu un soutien d'un fond d'investissement associé à l'université de Strasbourg, et avons établi un partenariat avec une compagnie de biotechnologie suisse.

#### *Évidence de réponse neurogénique dans la rétinopathie SCA7 chez la souris*

Nous étudions un modèle souris qui récapitule la rétinopathie affectant les patients SCA7. La rétinopathie de la souris se caractérise par deux types de mort neuronale : une mort par apoptose précoce, qui s'atténue avec le temps, et une mort « sombre » dont le mécanisme est inconnu, qui devient plus abondante avec l'évolution de la pathologie. Curieusement, nous avons noté que la mort par apoptose précoce ne mène pas à une diminution significative du nombre de photorécepteurs. Nous montrons maintenant que la perte de photorécepteurs par apoptose est compensée par la production de nouveaux neurones. Ces nouveaux photorécepteurs naissent par la conversion de cellules gliales de Müller en cellules neuronales. Ce phénomène est bien connu chez les vertébrés inférieurs comme le poisson, mais il n'a jamais été décrit chez les mammifères lors de pathologie de la rétine (Karam *et al.*, manuscrit en préparation).

## RESPONSABILITÉS ET DISTINCTIONS

Jean-Louis Mandel a été coordonnateur du département de médecine translationnelle et neurogénétique de l'IGBMC de juin 2010 à mai 2012. Il est membre du conseil d'administration de la Fondation Jean Dausset-Centre d'étude du polymorphisme humain (Paris), et du conseil scientifique de la Fondation ELA (European Leucodystrophy Association). Il est représentant du Collège de France au conseil scientifique de la Fondation Louis Jeantet (Genève).

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

**Publications dans des revues internationales avec comité de lecture**

Aliferis K., Hellé S., Gyapay G., Duchatelet S., Stoetzel C., Mandel J.L., Dollfus H., « Differentiating Alström from Bardet-Biedl syndrome (BBS) using systematic ciliopathy genes sequencing », *Ophthalmic Genet*, 33(1), 2012, 18-22 ; Epub 17 octobre 2011.

Amoasi L., Bertazzi D.L., Tronchère H., Hnia K., Chicanne G., Rinaldi B., Cowling B.S., Ferry A., Klaholz B., Payrastra B., Laporte J., Friant S., « Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice », *PLoS Genet.*, 8(10), 2012, e1002965 ; Epub 11 octobre 2012.

Anheim M., Mariani L.L., Calvas P., Cheuret E., Zagnoli F., Odent S., Seguela C., Marelli C., Fritsch M., Delaunoy J.P., Brice A., Durr A., Koenig M., « Exonic deletions of FXN and early-onset Friedreich ataxia », *Archives of Neurology*, 69, 2012, 912-916.

Anheim M., Tranchant C., Koenig M., « The autosomal recessive cerebellar ataxias », *N. Engl. J. Med.*, 366, 2012, 636-646.

Bloch-Zupan A., Jamet X., Etard C., Laugel V., Muller J., Geoffroy V., Strauss J.P., Pelletier V., Marion V., Poch O., Strahle U., Stoetzel C., Dollfus H., « Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in SMO2, causing major dental developmental defects », *Am. J. Hum Genet.*, 89(6), 2011, 773-81.

Böhm J., Biancalana V., Dechene E.T., Bitoun M., Pierson C.R., Schaefer E., Karasoy H., Dempsey M.A., Klein F., Dondaine N., Kretz C., Haumesser N., Poirson C., Toussaint A., Greenleaf R.S., Barger M.A., Mahoney L.J., Kang P.B., Zanolini E., Vissing J., Witting N., Echaniz-Laguna A., Wallgren-Pettersson C., Dowling J., Merlini L., Oldfors A., Bomme Ousager L., Melki J., Krause A., Jern C., Oliveira A.S., Petit F., Jacqueline A., Chaussonot A., Mowat D., Leheup B., Cristofano M., Poza Aldea J.J., Michel F., Furby A., Llona J.E., Van Coster R., Bertini E., Urtizberea J.A., Drouin-Garraud V., Bérout C., Prudhon B., Bedford M., Mathews K., Erby L.A., Smith S.A., Roggenbuck J., Crowe C.A., Brennan Spitala A., Johal S.C., Amato A.A., Demmer L.A., Jonas J., Darras B.T., Bird T.D., Laurino M., Welt S.I., Trotter C., Guicheney P., Das S., Mandel J.L., Beggs A.H., Laporte J., « Mutation spectrum in the large GTPase Dynamin 2 and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy », *Hum. Mutat.*, 33(6), 2012, 949-59.

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

Bricker D.K., Taylor E.B., Schell J.C., Orsak T., Boutron A., Chen Y.C., Cox J.E., Cardon C.M., Van Vranken J.G., Dephore N., Redin C., Boudina S., Gygi S.P., Brivet M., Thummel C.S., Rutter J., « A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in

yeast, Drosophila, and humans », *Science*, 337(6090), 2012, 96-100 (recommandé deux fois dans *Faculty 1000*).

Darcq E., Befort K., Koebel P., Pannetier S., Mahoney M.K., Gaveriaux-Ruff C., Hanauer A., Kieffer B.L., « RSK2 signaling in medial habenula contributes to acute morphine analgesia », *Neuropsychopharmacology*, 37(5), 2012, 1288-96.

Darcq E., Koebel P., Del Boca C., Pannetier S., Kirstetter A.S., Garnier J.M., Hanauer A., Befort K., Kieffer B.L., « RSK2 signaling in brain habenula contributes to place aversion learning », *Learn Mem*, 18(9), 2011, 574-8.

Elinati E., Kuentz P., Redin C., Jaber S., Vanden Meerschaut F., Makarian J., Koscinski I., Nasr-Esfahani M.H., Demiroglu A., Gurgan T., Louanjli N., Iqbal N., Bisharah M., Pigeon F.C., Gourabi H., De Briel D., Brignon F., Gitlin S.A., Grillo J.M., Ghaedi K., Deemeh M.R., Tanhaei S., Modarres P., Heindryckx B., Benkhalifa M., Nikiforaki D., Oehninger S.C., De Sutter P., Muller J., Viville S., « Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots », *Hum. Mol. Genet.*, 21(16), 2012, 3695-702.

Goula A.V., Pearson C.E., Della Maria J., Trottier Y., Tomkinson A.E., Wilson D.M. 3rd, Merienne K., « The nucleotide sequence, DNA damage location, and protein stoichiometry influence the base excision repair outcome at CAG/CTG repeats », *Biochemistry*, 51, 2012, 3919-32.

Hnia K., Kretz C., Amoasii L., Böhm J., Liu X., Messaddeq N., Qu C.K., Laporte J., « Primary T-tubule and autophagy defects in the phosphoinositide phosphatase jumpy/MTMR14 knockout mice muscle », *Adv. Enzyme Regul.*, 52, 2012, 98-107.

Koutsopoulos O.S., Koch C., Tosch V., Böhm J., North K.N., Laporte J., « Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and charcot-marie-tooth peripheral neuropathy », *PLoS One*, 6(11), 2011, e27498.

Li J., Kritzer M.D., Carlisle Michel J.J., Le A., Thakur H., Gayanilo M., Passariello C.L., Negro A., Daniel J.B., Oskouei B., Sanders M., Hare J.M., Hanauer A., Dodge-Kafka K.L., Kapiloff M.S., « Anchored p90 Ribosomal S6 Kinase 3 is Required for Cardiac Myocyte Hypertrophy », *Circ. Res.*, 2012.

Martelli A., Friedman L.S., Reutenauer L., Messaddeq N., Perlman S.L., Lynch D.R., Fedosov K., Schulz J.B., Pandolfo M., Puccio H., « Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia », *Dis. Model. Mech.*, 5(6), 2012, 860-9 ; Epub 26 juin 2012.

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

Schaefer E., Zalozyc A., Lauer J., Durand M., Stutzmann F., Perdomo-Trujillo Y., Redin C., Bennouna Greene V., Toutain A., Perrin L., Gérard M., Caillard S., Bei X., Lewis R.A., Christmann D., Letsch J., Kribs M., Mutter C., Muller J., Stoetzel C., Fischbach M., Marion V., Katsanis N., Dollfus H., « Mutations in SDCCAG8/NPHP10 Cause Bardet-Biedl Syndrome and Are Associated with Penetrant Renal Disease and Absent Polydactyly », *Mol. Syndromol.*, 1(6), 2011, 273-281.

Schneider A., Mehmood T., Pannetier S., Hanauer A., « Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the mrsk2\_KO mouse model of Coffin-Lowry syndrome », *J. Neurochem*, 119(3), 2011, 447-59.

Subramanian M., Rage F., Tabet R., Flatter E., Mandel J.L., Moine H., « G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting », *EMBO Rep.*, 12(7), 2011, 697-704 ; doi: 0.1038/embor.2011.76 (recommandé deux fois dans *Faculty 1000*).

Vasli N., Böhm J., Le Gras S., Muller J., Pizot C., Jost B., Echaniz-Laguna A., Laugel V., Tranchant C., Bernard R., Plewniak F., Vicaire S., Levy N., Chelly J., Mandel J.L., Biancalana V., Laporte J., « Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases », *Acta Neuropathol.*, 124(2), 2012, 273-83 (cité dans *Faculty 1000*).

Vasli N., Laugel V., Böhm J., Lannes B., Biancalana V., Laporte J., « A mild myotubular myopathy phenotype caused by multiple abnormal splicing variants in the MTM1 RNA », *Eur. J. Hum. Genet.*, 20(6), 2012, 701-4.

## Autres revues

Al-Qusairi L., Laporte J., « T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases », *Skelet Muscle*, 1(1), 2011, 26.

Biancalana V., Beggs A.H., Das S., Jungbluth H., Kress W., Nishino I., North K., Romero N.B., Laporte J., « Clinical utility gene card for centronuclear and myotubular myopathies », *Eur. J. Hum. Genet.*, 2012 ; doi: 10.1038/ejhg.2012.91.

Cowling B.S., Toussaint A., Muller J., Laporte J., « Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models », *PLoS Genet.*, 8(4), 2012, e1002595.

Hahn J.S., Hanauer A., « Stimulus-induced drop episodes in Coffin-Lowry syndrome », *Eur. J. Med. Genet.*, 55(5), 2012, 335-7.

Hnia K., Vaccari I., Bolino A., Laporte J., « Myotubularin phosphoinositide phosphatases: cellular functions and disease pathophysiology », *Trends Mol. Med.*, 18(6), 2012, 317-27.

Klionsky D.J. *et al.* (incluant Laporte J.), « Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy », *Autophagy*, 8(4), 2012, 445-544.

Mandel J.L., « Genomic revolution of rare disease diagnosis », *Presse Med.*, 2012, May, 41 Suppl 1:S26-8. Epub 2012 Apr 13

Millevoi S., Moine H., Vagner S., « G-quadruplexes in RNA biology », *Wiley Interdiscip Rev. RNA*, 3(4), 2012, 495-507.

Martelli A., Napierala M., Puccio H., « Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models », *Dis. Model. Mech. Mar.*, 5, 2012, 165-76.

## Chapitres de livres

Tronchère H., Bolino A., Laporte J., Payrastra B., « Myotubularins and associated neuromuscular diseases », *Clinical Lipidology*, 7(2), 2012, 151-62.

## CONFÉRENCES ET CONGRÈS

Symposium for the retirement of Pr. J.P. Frijns (University of Leuven), 17 sept. 2011 : « Fragile X syndrome: an overview of the last 30 years, from families to gene and mutations and to the latest therapeutic trials » (conférencier).

Journées parisiennes de pédiatrie, Paris les 7 et 8 octobre 2011, « Retard mental et analyse du genome à très haut débit » (conférencier).

Rare 2011, Rencontres Eurobiomed des maladies rares (Montpellier) du 2 au 4 novembre 2011 : « La révolution génomique du diagnostic des maladies rares », (conférencier).

Conférence débat de l'Académie des sciences « La génomique », Paris, 8 novembre 2011 (intervenant).

Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg (FMST), 1<sup>er</sup> séminaire « Médecine translationnelle : des modèles animaux à l'homme », Strasbourg le 30 novembre 2011 : « L'homme comme organisme modèle en génétique » (conférencier).

Journées d'actualités physiopathologiques de Strasbourg (JAPS), Strasbourg 1 et 2 décembre 2011, session « Génétique » (organisateur et modérateur) ; « Best of 2011 en génétique » (conférencier).

Assises de génétique (Marseille), 2 au 4 février 2012, « Impact de la variabilité du génome en pathologie » (conférencier, séance plénière).

Colloque « 20 years of unstable repeat expansion diseases: from mechanisms to treatment, where are we now? », (IGBMC, Illkirch), 9 juin 2012 (organisateur et intervenant).

*The 7th international conference on 'Unstable microsatellites and human disease'* (Mont-Saint Odile, France), 9 au 14 juin 2012 (Coorganisateur, avec les Prof. C. Pearson, U. of Toronto, L. Ranum, U. of Florida, États-Unis et Dr. K. Merienne, IGBMC).

AFPA (Association française de pédiatrie ambulatoire), 20<sup>e</sup> congrès national of ECPCP, « La pédiatrie : hier, aujourd'hui, demain, ici et ailleurs » (Strasbourg) 22-24 juin 2012, « La génétique hier, aujourd'hui, demain » (conférence inaugurale).

1<sup>st</sup> symposium of the French National Infrastructure Phenomin. *The Mouse model for basic and biomedical research (for the 10<sup>th</sup> anniversary of the Mouse Clinical Institute)* (ICS, IGBMC, Illkirch), 28 et 29 juin 2012 (membre du comité d'organisation).

## Conférences et activités grand public

2<sup>nd</sup> Forum européen de bioéthique (FEBS) : « Procréation : la famille en chantier », à Strasbourg du 30 janvier au 4 février 2012. Le Forum européen de bioéthique a pour vocation de rendre accessible à tous les questions de bioéthique. Jean-Louis Mandel est président et cofondateur du FEBS avec le Pr. Israel Nisand. Cette 2<sup>e</sup> édition avait inscrit à son programme 22 débats sur ce thème avec plus de 130 intervenants, et une vingtaine d'autres manifestations, (Forum jeune avec des lycéens, 3 projections de films suivis de débat, etc.) rassemblant un total de 9 000 auditeurs.

## 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 européens et un partenaire industriel aux États-Unis (2010-2014). Les projets d'Hélène Puccio sont par ailleurs financés par un ERC *starting grant* obtenu en 2007. Dans le cadre des programmes européens ERA-Net for Research Programmes on Rare Diseases, Michel Koenig est coordonnateur du projet Euro SCAR « Nosology and molecular diagnosis of the degenerative recessive ataxias » et Jocelyn Laporte participe avec 2 autres équipes au projet MTMPathies2 « MTM1 and MTMR2 myotubularins: biochemical activity and the regulation of membrane trafficking in health and disease » ainsi qu'au consortium européen « SARCOSSI : Sarcomeric Signals in muscle remodelling » (*training network FP7-PEOPLE*) avec 14 autres équipes. Nicolas Charlet est lauréat du prestigieux ERC *Starting grant* 2012, pour son projet sur les maladies à gain de fonction d'ARN.

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

