L'annuaire du Collège de France
Cours et travaux

108 | 2008
Annuaire du Collège de France 2007-2008

Génétique humaine

Jean-Louis Mandel

Édition électronique
URL : https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/176
DOI : 10.4000/annuaire-cdf.176
ISBN : 978-2-7226-0136-9
ISSN : 2109-9227

Éditeur
Collège de France

Édition imprimée
Date de publication : 1 décembre 2008
Pagination : 195-216
ISBN : 978-2-7226-0082-9
ISSN : 0069-5580

Référence électronique
Jean-Louis Mandel, « Génétique humaine », *L'annuaire du Collège de France* [En ligne], 108 | 2008, mis en ligne le 24 juin 2010, consulté le 22 août 2022. URL : http://journals.openedition.org/annuaire-cdf/176 ; DOI : https://doi.org/10.4000/annuaire-cdf.176

Tous droits réservés

Génétique humaine

M. Jean-Louis Mandel, membre de l'institut
(Académie des Sciences), professeur

Enseignement

Une série de 5 cours a été donnée au Collège en mars 2008 sur un thème de très grande actualité : « Évolution du génome humain et gènes soumis à sélection positive ». Des variations génétiques apparaissent à chaque génération et la plupart disparaissent ou restent extrêmement rares, mais certaines vont augmenter de fréquence, jusqu'à la fixation éventuelle dans certaines populations, sous l'effet de la dérive génétique et de pression de sélection négative (pour les variants délétères) ou positive (pour les variants ayant une valeur adaptative). Depuis plus de 50 ans, ces phénomènes ont été étudié chez l'homme pour des protéines puis pour des gènes « candidats » montrant des propriétés particulières : polymorphisme important (gènes HLA) ou montrant une grande variation de fréquence dans diverses populations (et il faut rappeler évidemment les travaux des professeurs au Collège de France, Jacques Ruffié et Jean Dausset).

Depuis une dizaine d'années, on constate une explosion des connaissances, grâce au séquençage du génome humain et de certains primates (chimpanzé en 2005, macaque rhésus en 2007) et à l'étude systématique du polymorphisme du génome humain (projet HapMap, caractérisant en 2007 plus de 3 millions de « Single Nucleotide Polymorphisms » et leur organisation en haplotypes dans 4 populations humaines), et aux spectaculaires développements technologiques qui sous-tendent ces grands projets, et qui permettent des études ciblées sur des gènes et des populations particulières. Le séquençage en cours du génome d'homme de Néandertal va apporter également des données précieuses. Cette série de cours a présenté les approches méthodologiques utilisées pour identifier des gènes soumis à sélection positive, et discuté certains des résultats les plus marquants obtenus dans les dernières années, en soulignant dans certains cas les controverses quant à leur interprétation.

Le premier cours a présenté l'organisation en haplotypes des polymorphismes du génome et son interprétation, et les types de mesures permettant d'estimer, pour différentes échelles de temps depuis la séparation de l'ancêtre commun au chimpanzé et à l'homme, la probabilité d'une sélection positive dans une région du génome : proportion de changements fonctionnels (affectant la séquence protéique) au cours de l'évolution des primates, distribution des fréquences de polymorphismes, et notamment des allèles dérivés (ceux qui ne correspondent pas à la séquence déduite de l'ancêtre commun des hominidés et du chimpanzé), et enfin, pour l'analyse des évolutions plus récentes, différences de fréquence allélique entre populations et longueur des haplotypes communs (cf. Sabeti *et al.,* Science 2006 ; Nielsen *et al.,* Nat. Rev. Genet. 2007). Les exemples classiques (étudiés au cours des 50 dernières années) de sélection dans les régions d'endémie paludéenne de mutations affectant les gènes globine et responsables d'hémoglobinopathies (anémie falciforme, thalassémies) ou la glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD), illustrent le fait que selon les cas, un même variant peut conférer un avantage sélectif ou être au contraire délétère. L'analyse approfondie des haplotypes permet maintenant d'estimer l'âge de ces variants. Un cours a été consacré aux découvertes récentes concernant des gènes et leurs variants associés aux différences de couleurs de peau, d'yeux ou de cheveux. La découverte du rôle du gène SLC24A5 dans la pigmentation de la peau humaine est particulièrement frappante, car débutant par l'analyse d'un mutant classique de pigmentation dans le poisson zèbre (le mutant golden), puis l'identification d'un homologue humain du gène, définissant une grande région de très faible diversité génétique dans la population européenne, et la présence d'une mutation inactivant ce gène dans cette population (Lamason *et al.,* 2005). L'hypothèse généralement admise est celle de la balance entre la protection contre l'effet mutagénique des UV dans des régions très ensoleillées, favorisant une peau foncée, et le rôle des UV dans la transformation de la vitamine D (antirachitique), favorisant une peau claire dans des régions peu ensoleillées. Des études ultérieures ont montré l'implication d'un gène similaire (SLC45A2) dans le même phénotype. Récemment, il a été montré qu'une combinatoire de polymorphismes dans 6 gènes est associée aux variations de pigmentation de la peau, des yeux et des cheveux, sans permettre une prédiction individuelle exacte de ces phénotypes (Sulem *et al.,* 2007). Le gène EDAR (récepteur de l'ectodysplasine) impliqué dans le développement de la peau, des cheveux et des glandes sudoripares, montre également des caractéristiques indiquant une sélection positive dans certaines populations.

Un cours a été consacré à l'adaptation génétique aux conditions alimentaires dans les populations humaines. On observe une forte sélection de variants non codants modifiant la régulation de l'expression de la lactase dans la population européenne, mais aussi dans d'autres populations pratiquant une agriculture pastorale, où le lait est devenu un apport alimentaire important (la sélection de variants différents est une exemple de convergence évolutive). Pour l'amylase (impliquée dans la digestibilité de l'amidon), c'est la variation du nombre de copies

du gène qui paraît conférer une avantage sélectif. Enfin, les études récentes de polymorphismes prédisposant au diabète de type 2 (Sladek *et al.,* 2007) sont en faveur de la « thrifty gene hypothesis » qui propose que des variants permettant de limiter la dépense énergétique dans des périodes de restriction alimentaire ont été sélectionnés, et prédisposent aux maladies métaboliques (diabète, obésité) dans le mode de vie actuel. Un autre cours a été consacré aux études, aux interprétations parfois controversées, impliquant des phénomènes de sélection dans l'évolution des fonctions cognitives pour les gènes FOXP2 (dans l'évolution du langage) et les gènes ASPM et MCPH1, dont des mutations rares sont associées à des microcéphalies monogéniques. Il est intéressant de noter que des études impliquent également le gène FOXP2 dans la vocalisation ultrasonique chez les souris, et dans l'apprentissage de chants d'oiseau (modèle du mandarin, ou zebra finch).

Les approches systématiques de recherche de régions soumises à sélection positive sur l'ensemble du génome ont été présentées et leurs limitations discutées (cf. Sabeti *et al.,* Nature 2007, et Barreiro *et al.,* de l'équipe de L. Quintana-Murci, Nature Genet. 2008). Le dernier cours a porté sur l'apparition ou la disparition de gènes au cours de l'évolution des grands primates. Ainsi, l'apparition de la vision trichromate apparaît corrélée à la perte de nombreux gènes de récepteurs olfactifs ou de l'organe voméronasal (gène TRPC2). La datation de l'inactivation dans l'évolution humaine d'un gène myosine (MYH16) dont l'expression est spécifique de muscles masticatoires, et du rôle de cet événement dans la gracilisation de la mâchoire des hominidés et dans le développement de l'encéphale, sont très controversés (Stedman *et al.,* 2004, McCollum *et al.,* 2006), illustrant les difficultés de ces approches.

Un cours au Collège et une conférence à l'Université et CHU Bordeaux 2 ont porté sur : Myopathies centronucléaires: un lien inattendu entre phosphoinositides et des protéines impliquées dans le remodelage membranaire (dynamine 2, amphiphysine) (cf. ci-dessous, rapport sur les travaux de recherche). Un cours (4 h) sur la génétique des maladies communes (multifactorielles) a été donné à l'Université de Strasbourg, et une conférence à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2 sur « Maladies monogéniques, du gène aux malades et aux familles ».

Un colloque intitulé « Actualités dans le domaine des maladies monogéniques : mécanismes physiopathologiques, approches thérapeutiques » a été organisé dans le cadre des enseignements de la chaire les 15 et 16 avril 2008, à l'amphithéâtre Guillaume Budé. Ce colloque soutenu par l'Association Française contre les Myopathies, qui a fait également partie de l'enseignement national pour les internes de la spécialité de génétique médicale, a été suivi par un public nombreux et attentif. Son programme a montré, au travers de 20 conférences, comment l'étude des mécanismes physiopathologiques de maladies monogéniques a permis de proposer et développer des stratégies thérapeutiques, allant dans plusieurs cas discutés au cours du colloque jusqu'à des essais cliniques. Les exposés ont également illustré la diversité des modèles expérimentaux utilisés : modèles cellulaires, modèles de souris

génétiquement modifiées reproduisant les mutations observées chez l'homme, mais aussi utilisation d'organismes tels que le nématode *C. elegans* et la drosophile, permettant des cribles génétiques (pour la recherche de gènes pouvant modifier le phénotype) ou pharmacologiques. Les aspects précliniques d'études physiopathologiques et de cibles thérapeutiques potentielles ont été abordés notamment pour le syndrome de retard mental avec X fragile (modèles drosophile et souris ayant abouti à l'identification de récepteurs au glutamate mGluR comme cible thérapeutique ; J.-L. Mandel, IGBMC, Illkirch/Strasbourg), la myopathie de Duchenne (modèles nématode et souris, Laurent Segalat, CGMC CNRS, Lyon/Villeurbanne), l'ataxie de Friedreich (modèles souris, Hélène Puccio, IGBMC Illkirch/Strasbourg), les myopathies dues à un déficit en alpha-sarcoglycane (modèle souris, Isabelle Richard CNRS/Généthon, Evry), et le syndrome CADASIL de démence vasculaire impliquant le gène NOTCH3 (modèle souris, Anne Joutel, INSERM/Paris 7). Le passage de l'étude physiopathologique à des essais cliniques en cours a été illustré par 1) Bart Loeys (Université de Gand), pour le syndrome de Marfan impliquant la voie de signalisation du TGFβ, avec des résultats prometteurs d'utilisation d'une thérapie pharmacologique (losartan) ; 2) Frédéric Becq (CNRS, Université de Poitiers) et Olivier Morand (Actelion Pharmaceuticals, Suisse), pour la proposition, à partir de l'étude de modèles cellulaires, de l'utilisation d'une molécule, le miglustat (utilisé dans le traitement de la maladie de Gaucher), pour un traitement spécifique des patients atteints de mucoviscidose et porteurs de la mutation la plus fréquente, ΔF508 ; 3) Jean Bastin (CNRS/Necker-Enfants Malades) pour la correction de déficits génétiques du métabolisme oxydatif mitochondrial par le bézafibrate ; 4) Nicolas Lévy (INSERM/CHU Timone Marseille), qui à partir de modèles cellulaires et de souris a proposé l'utilisation d'un traitement combiné par statines et aminobiphosphonates pour inhiber la prénylation des formes tronquées de prélamine 1 responsables de la progeria, une maladie exceptionnellement rare entraînant un vieillissement accéléré ; 5) Arnold Munnich (INSERM/Université Descartes) qui a décrit un premier essai clinique d'un chélateur du fer dans l'ataxie de Friedreich. Thomas Voit (Institut de Myologie, Paris) a présenté les propriétés d'une molécule (PTC124) permettant un « readthrough » traductionnel de mutations non-sens, mutations retrouvées fréquemment dans de très nombreuses maladies génétiques, et les stratégies d'essais cliniques chez des patients atteints de mucoviscidose ou de myopathie de Duchenne et porteurs de telles mutations. Des approches de thérapie génique ont été présentées : 1) pour la myopathie de Duchenne avec la stratégie de « saut d'exon » pour rétablir une phase de lecture dans l'ARN messager dystrophine, par Gert-Jan Van Ommen (Center for Human Genetics, Leiden), qui développe une stratégie par oligonucléotides anti-sens, qui a fait l'objet d'une première étude clinique avec des résultats biologiques encourageants ; et Luis Garcia (Institut de Myologie, INSERM), qui utilise un vecteur viral (AAV), et également la correction de cellules souches ; 2) pour l'adrénoleucodystrophie, une maladie démyelinisante gravissime, par Nathalie Cartier (INSERM/Hôpital Saint-Vincent-de-Paul) qui développe avec Patrick Aubourg la thérapie génique utilisant un vecteur lentiviral, et qui a présenté les premières données de l'essai clinique en

cours, le premier pour ce type de vecteur. Alain Fischer (INSERM/Hôpital Necker Enfants Malades), pionnier dans le domaine de la thérapie génique, a brossé un tableau des déficits immunitaires monogéniques, et montré comment la compréhension des mécanismes permet de définir des approches thérapeutiques rationnelles par supplémentation des molécules déficientes, immunomodulation par des cytokines, thérapie cellulaire ou génique. Philippe Coubes (Centre Gui de Chauliac/CNRS/INSERM Montpellier) a montré de manière spectaculaire comment, grâce aux progrès dans le domaine des neurosciences, des approches neurochirurgicales de neuromodulation électrique du cerveau permettent d'obtenir des résultats thérapeutiques importants dans des maladies génétiques du tonus (dystonie) ou du mouvement (dyskinésie). Des aspects plus généraux de la problématique du développement thérapeutique pour les maladies rares que sont les maladies monogéniques ont été présentés par Philippe Moullier (INSERM et CHU Nantes, et College of Medicine, Gainesville FL USA) : Etudes précliniques en thérapie génique ; Ségolène Aymé (Orphanet, INSERM SC11, Paris) : Des thérapies pour les maladies génétiques, succès et revers du règlement sur les médicaments orphelins ; Bernard Barataud (Généthon, Evry) : Généthon, de la cartographie du génome à l'Autorisation de Mise sur le Marché : le chemin du médicament. Enfin, une douzaine de communications par affiche sur les thèmes du colloque ont été présentées par de jeunes chercheurs, qui ont fait l'objet de discussions animées.

Recherche

Le groupe de recherche en génétique humaine fait partie du département de Neurobiologie et Génétique de l'IGBMC (Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104 du CNRS, Unité Inserm U596 et Université Louis Pasteur de Strasbourg). Il se consacre essentiellement 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 nommé en juin 2008 directeur de l'Institut Clinique de la Souris (ICS), une très importante plateforme technologique associée à l'IGBMC et impliquée dans la création et le phénotypage de souris génétiquement modifiées.

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

1) Syndrome de retard mental avec chromosome X fragile et fonction de la protéine FMRP (avec Hervé Moine, CR1 CNRS).

2) Myopathies myotubulaire et centronucléaires et analyse fonctionnelle d'une nouvelle famille de phosphoinositides phosphatases : les myotubularines (équipe codirigée avec Jocelyn Laporte, promu DR2 INSERM en 2007, et labellisée équipe FRM 2007). Jocelyn Laporte a été également lauréat d'un Prix du comité Alsace de la Fondation pour la Recherche Médicale.

3) En collaboration avec le Pr Hélène Dollfus (EA3949 et Equipe AVENIR/ INSERM ; Faculté de Médecine de Strasbourg), nous menons une étude génétique du syndrome de Bardet-Biedl.

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.

L'équipe dirigée par Michel Kœnig (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.

Hélène Puccio (promue DR2 INSERM en 2007) et son équipe s'intéressent aux mécanismes physiopathologiques de l'ataxie de Friedreich. Hélène Puccio est lauréate du prestigieux « ERC starting grant » du Conseil Européen de la Recherche pour son projet « Comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les ataxies récessives liées à des déficits mitochondriaux : implication du métabolisme des noyaux fer-soufre ».

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

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

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

Le syndrome X-fragile représente la forme la plus fréquente de retard mental monogénique. Ce syndrome résulte d'une expansion instable de répétitions CGG dans le gène *FMR1*, entraînant sa répression transcriptionnelle. *FMR1* code pour la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein) qui lie des ARN messagers au sein de complexes ribonucléoprotéiques associés aux polysomes et joue un rôle de régulation de la traduction et/ou de transport de ces ARNm. Afin de caractériser la fonction et les mécanismes d'action de cette protéine, nous avons entrepris d'identifier et caractériser des ARNm se liant à FMRP et pouvant constituer des cibles de son action. Nous avons montré antérieurement que FMRP se lie de manière spécifique et avec une forte affinité aux ARNm contenant un motif structural de type « G(uanine)-quartet » (Schaeffer *et al.,* 2001). Nous avions retrouvé ce motif dans l'ARNm de la phosphatase PP2A et suggéré un rôle de FMRP dans le contrôle traductionnel de cette importante protéine régulatrice (Castets *et al.,* 2005). Nos travaux récents suggèrent que l'interaction de FMRP

avec son propre ARNm, au niveau d'un G-quartet présent dans la région codante (exon 15), peut moduler l'épissage alternatif du gène *FMR1*. En effet, ce G-quartet présente des propriétés activatrices de l'épissage et la liaison de FMRP avec ce motif pourrait constituer une boucle d'autorégulation (Didiot *et al.,* 2008).

En collaboration avec B. Bardoni (CNRS, Nice), nous avons caractérisé un nouvel ARNm lié par FMRP, l'ARNm *SOD1*. L'équipe de B. Bardoni a observé que l'expression de la protéine superoxyde dismutase 1 codée par ce gène était diminuée dans le cerveau des souris déficientes en FMRP. Nous avons montré que l'ARNm SOD1 ne contient pas de motif G-quartet et FMRP, en se liant à un motif structuré en tige-boucle présent au niveau du site d'initiation de la traduction, stimulerait la traduction de cet ARNm (résultats soumis).

Le mécanisme d'action de FMRP sur ses différents ARNm cibles est encore mal compris. Nous avons récemment montré expérimentalement la présence de motifs G-quartet et leur liaison par FMRP au niveau de la région 3′ non traduite de deux gènes importants pour la plasticité synaptique et précédemment proposés comme cible de FMRP (résultats non publiés). Nous avons entrepris d'analyser et comparer l'impact de FMRP sur le métabolisme de ces deux ARNm en culture de neurones primaires de souris : traduction, localisation, stabilité.

En collaboration avec l'équipe du Dr C. Branlant (CNRS Nancy) nous avons mis en évidence une nouvelle interaction entre FMRP et le complexe SMN d'assemblage de particules ribonucléoprotéiques du spliceosome (Piazzon *et al.,* 2008). Le complexe SMN est déficient dans une importante pathologie du motoneurone, l'amyotrophie spinale (SMA).

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

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

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). Les CNM sont regroupées en trois classes, et nous avons participé à l'identification de tous les gènes impliqués jusqu'à présent. La forme liée au chromosome X, appelée myopathie myotubulaire, est la plus sévère et se traduit par une hypotonie généralisée qui entraîne souvent la mort du patient dans la première année. Elle est due à des mutations dans le gène

MTM1 codant pour la myotubularine (Laporte *et al.,* 1996), dont nous avons par la suite montré qu'elle définit une nouvelle famille de phosphoinositides 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, 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 mutées dans le gène BIN1 codant pour l'amphiphysine 2, une protéine interagissant avec la dynamine (Nicot *et al.,* 2007).

Nous avons poursuivi, en collaboration avec P. Guicheney (Paris), V. Biancalana (Strasbourg) et des cliniciens, l'étude des mutations dans la dynamine 2, dont certaines sont associées à une forme de neuropathie périphérique de Charcot-Marie-Tooth et tentons d'établir des corrélations génotype-phénotype. L'étude d'une grande famille avec myopathie centronucléaire dominante due à une mutation dynamine 2 non décrite antérieurement, a montré également des signes de neuropathie périphérique et de déficit cognitif peu sévères, suggérant un recouvrement phénotypique entre myopathie et neuropathie, et une action sur le système nerveux central, pour certaines mutations de la dynamine 2 (Echaniz-Laguna *et al.*, 2007).

Nous avons poursuivi la recherche de gènes impliqués dans les myopathies centronucléaires récessives. Les familles recrutées étant peu informatives pour une analyse de liaison, nous avons opté pour une recherche de gènes candidats identifiés par analyse bio-informatique, complémentée dans les familles consanguines, par cartographie d'homozygotie sur puces SNPs. L'amphiphysine 2 était un bon candidat fonctionnel car cette protéine régule le trafic membranaire comme la myotubularine (Cao *et al.*, 2007 et 2008) et la dynamine 2, et un mutant de drosophile montre une faiblesse musculaire associée à des anomalies des tubules-T. Par séquençage direct, et à l'aide de cartographie par homozygotie, nous avons trouvé 4 variants à l'état homozygote dans des familles consanguines, dont deux mutations non sens (Nicot *et al.,* 2007, et résultats non publiés). Les mutations faux-sens diminuent la fonction de tubulation des membranes alors qu'un des codons stop prématurés produit une protéine stable qui ne peut plus se lier avec un interacteur précédemment connu de l'amphiphysine 2, la dynamine 2. La deuxième mutation stop, identifiée très récemment dans une nouvelle famille, est en cours d'analyse. Ce travail a donc révélé un lien moléculaire et fonctionnel entre 2 formes de myopathies centronucléaires.

Nous avons poursuivi d'autre part nos travaux sur la physiopathologie de la forme liée au chromosome X, par l'étude du modèle souris de déficience en myotubularine que nous avons construit antérieurement (Buj-Bello *et al.,* 2002). Une étude transcriptomique globale au cours du développement de la pathologie musculaire dans ce modèle, ainsi que dans des biopsies musculaires de patients (en collaboration

avec A. Beggs, Harvard Med. School) a montré des anomalies importantes (particulièrement dans le modèle souris) de l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique. Nous avons confirmé ces anomalies au niveau protéique, et montré que certaines d'entre elles survenaient précocément au cours du développement de la pathologie. Nous avons observé d'autre part des anomalies précoces de l'organisation des tubules T, et avons entrepris, en collaboration avec Vincent Jacquemond (Université Lyon 1/CNRS, Villeurbanne) une étude électrophysiologique des courants calciques des fibres musculaires des souris déficientes en myotubularine, qui montrent certaines altérations précoces dans l'évolution de la pathologie (manuscrit en préparation). Les anomalies de l'organisation des tubules T et de la fonctionnalité du couplage excitation contraction pourraient rendre compte de l'importante hypotonie musculaire observée chez les patients. Ceci permet de relier fonctionnellement les 3 protéines connues mutées dans les myopathies centronucléaires, à la fois par leur interaction avec les phosphoinositides, et par leur rôle dans l'organisation des tubules T.

Nous avons aussi poursuivi une approche de thérapie génique à l'aide de vecteur AAV (adeno-associated virus) exprimant la myotubularine, en collaboration avec le Généthon (Evry). Des résultats très positifs ont été obtenus sur notre modèle souris. En effet une seule injection intramusculaire dans des souris déjà atteintes de faiblesse musculaire améliore de manière spectaculaire l'état pathologique du muscle, corrige le positionnement des noyaux et augmente la masse musculaire ainsi que la force, à un niveau quasi-normal (Buj-Bello *et al.,* 2008). L'utilisation de la même approche pour surexprimer la myotubularine suggère que cette protéine régule l'homéostasie du sarcolemme, la membrane plasmique des fibres musculaires (Buj-Bello *et al.,* 2008). Nous testons maintenant par la même approche la capacité de protéines homologues à la myotubularine (MTMR1 et MTMR2) à améliorer le phénotype des souris Mtm1 KO, ce qui permettrait à terme d'envisager une thérapie par réexpression des gènes homologues et ainsi diminuer la réponse immunitaire. Sur un plan plus fondamental, ceci apportera également des informations précieuses sur les mécanismes de spécificité musculaire liées aux mutations du gène MTM1, son plus proche homologue MTMR2 étant muté dans une forme récessive sévère de neuropathie périphérique démyélinisante, avec atteinte des cellules de Schwann (Chojnowski *et al.,* 2007) et donc nous permettre de discriminer entre les alternatives de spécificité d'expression ou liée à la structure de la protéine.

En collaboration avec l'équipe de T. Ogata (Tokyo), nous avons montré que le gène CXorf6, adjacent au gène MTM1, est muté dans des cas d'anomalies du développement génital masculin (hypospadias) (Fukami *et al.*, 2007). Le gène CXorf6 code pour une protéine avec un domaine de type mastermind, a des propriétés transactivatrices sur un gène de la voie Notch, le gène Hes3, et son inhibition augmente la production de testostérone par des cellules de Leydig tumorales (Fukami *et al.*, 2008).

3) Analyse génétique du syndrome de Bardet-Biedl
(collaboration avec le Pr H. Dollfus)

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS), de transmission autosomique récessive, associe rétinite pigmentaire, obésité, polydactylie, anomalies rénales et atteinte cognitive. Il est caractérisé par une étonnante hétérogénéité génétique, contrastant avec la spécificité de la présentation clinique. De 2000 à 2005, 9 gènes (dénommés BBS1 à 9) avaient été identifiés par des équipes américaines et anglaises, dont les mutations ne rendent compte que d'environ 50 % des patients. L'identification de ces gènes, codant pour des protéines de types très divers et dont les fonctions étaient initialement inconnues, a permis de relier le syndrome BBS à des défauts dans l'assemblage ou la fonction de structures ciliées (cil primaire) et du centrosome. Nous participons à une étude initiée par le Prof. Hélène Dollfus (Faculté de Médecine de Strasbourg), visant notamment à identifier de nouveaux gènes BBS. L'utilisation d'une approche de cartographie par homozygotie dans des familles consanguines, à l'aide de « puces SNP (single nucleotide polymorphism) », en collaboration avec l'équipe de bioinformatique d'Olivier Poch à l'IGBMC nous a permis d'identifier en 2005-2006 deux nouveaux gènes (BBS10 et BBS12) particulièrement importants. BBS10 est un gène majeur, dont les mutations sont retrouvées chez plus de 20 % des patients (Stoetzel *et al.,* 2006), et BBS12 rend compte de 5-6 % des familles. De manière surprenante, alors que 8 des 9 gènes BBS précédemment identifiés sont très conservés dans l'évolution, entre tous les organismes ciliés (de l'homme au nématode, et même à l'algue Chlamydomonas), les gènes BBS10 et BBS12 codent pour des protéines spécifiques des vertébrés et dont la séquence protéique évolue beaucoup plus rapidement que pour les autres gènes BBS (à l'exception du gène BBS6). BBS10 et BBS12 appartiennent, comme BBS6 à la superfamille des chaperonines de type II (Stoetzel *et al.,* 2007). Nous avons montré que ces 3 gènes définissent une branche spécifique des vertébrés au sein de cette superfamille dont les autres membres ont une origine beaucoup plus ancienne (Stoetzel *et al.,* 2007). Le phénotype indistinguable des patients porteurs de mutations dans des gènes BBS différents suggère que les protéines correspondantes pourraient être impliquées dans des complexes macromoléculaires (l'absence de l'un ou l'autre d'entre eux ayant alors le même effet négatif sur la fonction du complexe). Des travaux récents paraissent confirmer une telle hypothèse pour 7 protéines BBS présentes de manière stoechiométrique dans un complexe nommé BBSome (Nachury *et al.,* 2007). Les protéines BBS6, 10 et 12 sont absentes de ce complexe, et on peut donc faire l'hypothèse d'un complexe « chaperonin-like » qui contiendrait ces 3 protéines. Des études sont entreprises dans cette direction, en collaboration également avec l'équipe de D. Moras à l'IGBMC.

La création de mutants avec inactivation conditionnelle des gènes BBS10 et 12 chez la souris est en cours, 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 suggèrent que les protéines BBS et le cil primaire jouent un rôle important dans la différenciation des préadipocytes et dans l'adipogenèse (résultats soumis).

La stratégie d'identification 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 au contraire 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 récemment entrepris une nouvelle approche basée sur l'observation qu'une proportion en général faible de mutations responsables de perte de fonction correspondent à des délétions touchant plusieurs exons du gène cible. La très haute densité de puces ADN utilisables pour l'analyse de SNPs et de dosage génique devrait permettre la détection de telles délétions, notamment en sélectionnant les régions d'homozygotie chez des patients issus de familles consanguines. Une vingtaine de familles avec syndrome de Bardet-Biedl et sans mutation dans les gènes connus sont actuellement en cours d'analyse sur des puces contenant 1,8 million de positions analysables (puces 6.0 d'Affymetrix).

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

L'équipe de Y. Trottier étudie la physiopathologie de la maladie de Huntington (MH) et l'ataxie spinocérébelleuse de type 7 (SCA7). Ces maladies neurodégénératives héréditaires sont dues à une expansion de répétitions CAG codant pour un homopolymère de glutamines (polyQ) dans des protéines cibles spécifiques de chaque maladie. L'expansion de polyQ (au-delà d'environ 39 résidus) confère aux protéines mutées de nouvelles propriétés neurotoxiques, qui mènent entre autres à leur accumulation et leur agrégation dans le noyau des neurones, entrainant une dérégulation de l'expression de certains gènes et une dysfonction puis une mort neuronale, avec une spécificité d'atteinte des neurones qui diffère selon la maladie.

L'équipe s'intéresse aux propriétés structurales et d'agrégation des polyQ. En collaboration avec le D[r] A. Podjarny (IGBMC), nous cherchons à élucider la structure spatiale de polyQ, un motif retrouvé dans un grand nombre de protéines, mais dont la fonction reste inconnue. Notre stratégie consiste à déterminer la structure de polyQ de longueur déterminée interagissant avec un partenaire, en l'occurrence un anticorps monoclonal anti-polyQ, que nous avions caractérisé antérieurement (Trottier *et al.,* 1995, Trottier 2003). Nous avons déjà élucidé la structure de l'anticorps dans deux configurations différentes. Cette étape préliminaire nous guide actuellement dans l'analyse des cristaux formés par le complexe polyQ:anticorps. Cette stratégie doit nous permettre de révéler la structure de la polyQ, mais aussi celle de l'anticorps, ce qui devrait fournir une base pour générer par modélisation des inhibiteurs de l'agrégation. D'autre part, sur la base de nos travaux antérieurs (Klein *et al.,* 2007), nous avons conçu un

polypeptide ayant des propriétés anti-agrégation *in vitro*. Nous poursuivons l'étude du potentiel thérapeutique de ce polypeptide dans un modèle drosophile de maladie à polyQ en collaboration avec le Dr Hervé Tricoire (CNRS/U. Paris 7).

Également dans une perspective thérapeutique, nous étudions deux molécules chimiques qui semblent prévenir l'accumulation ainsi que l'agrégation des protéines mutées. Les analyses sont effectuées *in vitro* dans un modèle cellulaire et dans un modèle souris. Nous nous intéressons également aux mécanismes d'action de ces molécules. Ce projet est issu d'une collaboration avec le Dr Anne Bertolotti (Cambridge, UK) (Rousseau *et al.,* 2004 ; Dehay *et al.,* 2007) et le Dr Nicolas Winssinger (ISIS, Strasbourg).

Afin d'identifier les mécanismes de dysfonction et de dégénérescence neuronale, nous étudions depuis plusieurs années un modèle souris SCA7, qui récapitule la dégénérescence rétinienne observée chez les patients. La rétine de ces souris se développe normalement jusqu'à 3 semaines d'âge, puis l'activité mesurée par électrorétinogramme (ERG) diminue progressivement et s'accompagne d'anomalies morphologiques des photorécepteurs : une perte des segments externes et internes, une disparition des cils connecteurs associée à une réapparition de centrosomes ou de cils primaires périnucléaires, une altération de l'architecture du noyau avec une décondensation de la chromatine (Helmlinger *et al.,* 2004 ; Yefimova *et al.,* manuscrit en préparation). L'étude du profil transcriptionnel de la rétine des souris SCA7 a révélé une forte répression des gènes spécifiques des photorécepteurs, notamment des facteurs de transcription (Nrl, Crx, Nr2e3) qui contrôlent la différenciation des photorécepteurs (Abou-Sleymane *et al.,* 2006 ; Helmlinger *et al.,* 2006). Ces données suggèrent que l'ataxine-7 mutée compromet le programme génétique de différenciation des photorécepteurs. Ces photorécepteurs non différenciés et non fonctionnels survivent néanmoins jusqu'à un stade tardif de la pathologie, où l'activité ERG est absente.

Plusieurs voies pathogéniques pourraient participer à cette « dédifférenciation » et sont actuellement à l'étude dans notre laboratoire. Premièrement, l'ataxine-7 mutée s'agrège dans les photorécepteurs et cause un stress en activant la voie Jnk/c-Jun (Mérienne *et al.,* 2003). Nous avons montré que c-Jun régule le facteur Nrl, et que l'inactivation génétique de c-Jun retarde la rétinopathie des souris SCA7 (Mérienne *et al.,* 2007). Deuxièmement, comme l'ataxine-7 fait partie du complexe TFTC qui régule la transcription en acétylant les histones (Helmlinger *et al.,* 2004), il semble que l'ataxine-7 mutée causerait une dysfonction de TFTC qui mènerait à la décondensation générale de la chromatine (par hyperacétylation) et à la dérégulation des gènes spécifiques aux photorécepteurs (Helmlinger *et al.,* 2006). Troisièmement, nous avons récemment observé une activation microgliale importante aux stades précoces de la rétinopathie de ces souris. Nous tentons actuellement de savoir quel est le rôle de l'activation de la microglie : soit la sécrétion de facteurs de survie, menant peut-être les photorécepteurs à se dédifférencier, ou bien la phagocytose de la couche des segments des photorécepteurs.

Quatrièmement, nous avons constaté que la rétinopathie s'accompagne d'un stress oxydatif précoce important. Le rôle du stress oxydatif, qui est aussi présent dans la pathogenèse de la maladie de Huntington (MH), est actuellement à l'étude dans la rétinopathie de ce modèle SCA7.

L'expansion CAG dans le locus HD muté montre une forte instabilité -avec une tendance à un allongement additionnel- dans le striatum, la région cible principale de la pathologie, et peu d'instabilité dans le cervelet, une région épargnée. Comme les études corrélatives génotype-phénotype antérieures ont révélé que plus l'expansion est longue, plus la pathologie est précoce et sévère, il est probable que l'instabilité — et l'allongement — de l'expansion CAG dans le striatum contribue à la dégénérescence sélective de cette région du cerveau. K. Mérienne étudie les mécanismes menant à l'instabilité sélective de l'expansion CAG dans le striatum.

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

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

L'ataxie de Friedreich est une maladie autosomique récessive, gravement invalidante, caractérisée par une dégénérescence spino-cérébelleuse et une cardiomyopathie hypertrophique. Elle est due à la diminution quantitative d'une protéine mitochondriale, la frataxine, qui entraîne un déficit fonctionnel des protéines fer-soufre (Fe-S) et une accumulation intramitochondriale de fer. Cette équipe a créé depuis plusieurs années des modèles souris de l'ataxie de Friedreich, par inactivation conditionnelle spatio-temporelle (système Cre-Lox) du gène de la frataxine (Puccio *et al.,* 2001 ; Simon *et al.,* 2004). Ces modèles conditionnels reproduisent l'essentiel des caractéristiques physiopathologiques et biochimiques de la pathologie humaine.

Dans la levure, la mitochondrie joue un rôle central pour la biosynthèse de tous les noyaux Fe-S, indépendant de leur localisation cellulaire. Cependant, chez les mammifères, le rôle central de la mitochondrie reste controversé puisqu'une machinerie cytosolique d'assemblage des centres Fe-S indépendante a été proposée. A travers les différents modèles murins générés, nous avons récemment montré que la frataxine est nécessaire pour la biogenèse d'enzymes Fe-S nucléaires et cytosoliques, et qu'il n'existe donc pas de machinerie de biosynthèse des noyaux Fe-S chez les mammifères complètement indépendante de la mitochondrie (Martelli *et al.,* 2007). Ces résultats ouvrent la porte sur de nouvelles pistes physiopathologiques, notamment la voie de réparation d'ADN. Une collaboration avec l'équipe de Pr R. Lill (Marburg, Allemagne) a permis de montrer que la protéine cytosolique huNbp35, une P-loop NTPase, est essentielle pour les protéines à noyau Fe-S cytosoliques et nucléaires et joue un rôle dans la régulation du fer (Stehling *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats démontre l'existence d'une machinerie complexe pour l'assemblage des protéines à noyau Fe-S qui est peu étudiée chez les

mammifères. L'étude fondamentale sur le métabolisme des protéines à Fe-S proposée dans le cadre de notre projet ERC permettra la compréhension des conséquences d'un déficit du métabolisme Fe-S de la mitochondrie dans les cellules neuronales.

La frataxine (FXN) est une protéine mitochondriale synthétisée sous forme d'un précurseur de 210 acides aminés. Son import et sa maturation dans la mitochondrie impliquent deux clivages N-terminaux. Cependant, le site final de clivage de la forme mature m-FXN est sujet de controverses. En effet, trois formes différentes de la protéine mature ont été décrites : depuis 1998, une protéine commençant à l'acide aminé 56 (m_{56}-FXN) et deux autres récemment décrites en 2007, débutant à l'acide aminé 78 ou 81 respectivement (m_{78}-FXN- and m_{81}-FXN). Par une analyse de spectrométrie de masse (en collaboration avec Manuela Argentini, IGBMC), nous avons démontré que m_{81}-FXN était la forme mature majoritaire *in vivo*, et que les deux autres formes décrites n'existaient pas sous forme endogène (Schmucker *et al.*, 2008). Nous avons également démontré que la forme m_{78}-FXN est capable de restaurer la survie cellulaire de cellules déficientes en frataxine. De plus, par des essais de mutagénèse dirigée, nous avons déterminé que la maturation se faisait en deux étapes et que les formes m_{56}-FXN et m_{78}-FXN pouvaient être produites en conditions cellulaires lorsque que la maturation normale de la protéine était perturbée.

Les lignées cellulaires de patients sont peu utiles pour des analyses biochimiques car phénotypiquement normales puisqu'elles sont issues de cellules épargnées par la maladie (lymphoblastes et fibroblastes). L'établissement de lignées cellulaires directement à partir des souris mutantes constitue donc un excellent système pour étudier les anomalies biochimiques liées à l'absence totale de frataxine, donc plus sévère, ainsi que pour un criblage à grande échelle de molécules potentiellement thérapeutiques.

Nous avons utilisé des lignées cellulaires murines portant un allèle d'inactivation conditionnelle de la frataxine en combinaison avec l'expression d'une recombinase EGFP-Cre (en collaboration avec Brigitte Kieffer, IGBMC) pour isoler par cytométrie de flux des cellules murines complètement délétées pour la frataxine. Ce système nous a permis de montrer que l'absence totale en frataxine dans des fibroblastes conduit à la mort cellulaire, probablement par un arrêt du cycle cellulaire, soulignant une nouvelle fois le rôle important de la frataxine (Carelle-Calmels *et al.*, soumis).

Nous avons généré un modèle cellulaire par une stratégie d'antisens par ribozyme, qui présente un défaut de prolifération cellulaire et certaines caractéristiques moléculaires de l'AF. Dans le but d'identifier de nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques, en collaboration avec la plateforme de criblage du genopôle Alsace-Lorraine, nous avons recherché des molécules susceptibles de restaurer le retard de croissance cellulaire par criblage robotisé des molécules de la chimiothèque Prestwick (1 500 molécules) (Carelle-Calmels, en préparation). Le criblage s'est

effectué en 3 étapes : criblage initial, confirmation et dose-réponse. Après confirmation, nous avions identifié 48 molécules ayant un effet positif sur la croissance des cellules déficientes en frataxine. Malheureusement, aucune des molécules n'a été retenue lors de la courbe dose-réponse. Un criblage à plus grande échelle est envisagé pour augmenter les chances de réussite.

Récemment, l'anomalie génétique responsable d'une myopathie mitochondriale avec acidose lactique a été identifiée : une mutation du gène ISCU menant à une anomalie d'épissage de son ARN messager. Ce gène est impliqué dans l'assemblage des noyaux Fe-S et est un partenaire direct de la frataxine. En accord avec le rôle de IscU, un déficit en succinate déshydrogénase et aconitase ainsi qu'une surcharge en fer est observée dans les muscles des patients. Nous avons récemment généré un modèle murin déficient en frataxine dans le muscle squelettique. Ce modèle musculaire montre que l'absence totale de frataxine dans le muscle induit une myopathie mitochondriale avec des fibres musculaires de tailles variées, la présence de noyaux centraux, des fibres rouges déchiquetées (ragged red fibers), des dépôts mitochondriaux de fer et un déficit spécifique des protéines à noyau Fe-S ainsi qu'une acidose lactique (Wattenhofer-Donzé, manuscrit en préparation). Il est intéressant de noter un cas clinique reporté dans la littérature d'un garçon avec un diagnostic moléculaire de l'AF présentant en plus des signes cliniques et électrophysiologiques d'AF, une myopathie mitochondriale sévère avec une prolifération mitochondriale et une structure anormale des fibres musculaires. Ceci suggère qu'il serait peut-être intéressant d'élargir le phénotype associé à la perte de fonction en frataxine, en la recherchant dans des myopathies mitochondriales non-expliquées. Le D^{r} Marie Wattenhofer-Donzé, qui étudie ce modèle, est titulaire d'un poste ATER du Collège de France pour les années 2006-2008.

Génétique moléculaire des ataxies récessives (équipe M. Koenig)

L'équipe avait précédemment identifié les gènes impliqués dans des formes d'ataxie avec apraxie oculomotrice (AOA1/gène aprataxine en 2001 ; AOA2/gène senataxine en 2004) ainsi que plusieurs familles avec une forme très rare d'ataxie avec apraxie oculomotrice due à une mutation fondatrice dans le gène MRE11 (Fernet *et al.,* 2005, Khan *et al.,* 2008). Ces gènes codent pour trois protéines nucléaires, dont les deux premières sont impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN. L'analyse clinique de patients AOA2 confirmés par l'identification de mutations du gène de la sénataxine nous permet de mieux définir cette nouvelle forme d'ataxie, en particulier l'âge de début toujours supérieur à 8 ans et l'association avec une élévation de l'alpha-fœtoprotéine sérique qui en font de très bons critères d'orientation diagnostique, et d'identifier une élévation modérée de l'alpha-fœtoprotéine chez les porteurs hétérozygotes (Anheim *et al.,* 2008, Tazir *et al.,* soumis, Gazulla *et al.,* soumis). D'autres loci d'ataxie récessive ont été identifiés par analyse de liaison dans des familles consanguines avec d'autres formes d'ataxie, et la recherche des gènes mutés a été entreprise (Gribaa *et al.,* 2007). Nous avons ainsi participé à l'identification du gène du syndrome de Marinesco-Sjögren, qui

associe une ataxie précoce, une cataracte et un retard du développement psychomoteur, en collaboration avec l'équipe du Pr A.-E. Lehesjoki (Helsinki) (Anttonen *et al.,* 2005).

Nous avons plus récemment identifié un nouveau gène d'ataxie récessive par l'analyse d'une grande famille consanguine d'origine algérienne (Lagier-Tourenne *et al.*, 2008). Les patients de quatre autres familles se sont avérés avoir des mutations du même gène. Ce gène code pour une kinase mitochondriale, *ADCK3*, impliquée dans la régulation de la synthèse du coenzyme Q10, un lipide essentiel au transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette ataxie est donc la cinquième forme d'ataxie récessive due à un déficit d'une protéine mitochondriale, confirmant que le dysfonctionnement de cette organelle en général et de la chaîne respiratoire en particulier, est la cause directe des mécanismes dégénératifs des voies cérébelleuses et spinocérebelleuses dans un nombre important de cas. L'analyse rétrospective des patients avec mutations *ADCK3* confirme la présence d'un déficit modéré en coenzyme Q10 dans les fibroblastes en culture et d'une élévation modérée des lactates sanguins, au moins lors d'un exercice musculaire. Nous avons étudié l'expression d'*ADCK4*, qui est le paralogue le plus proche d'*ADCK3*, dans les lignées de patients mutés pour *ADCK3*. La divergence entre les gènes *ADCK3* et – 4 a probablement commencé au moment de la duplication génomique liée à l'apparition des vertébrés. La divergence avec les autres membres de la famille ADCK (*ADCK1*, – 2 et – 5) est beaucoup plus ancienne puisque déjà présente chez les bactéries. Nous avons trouvé à la place d'une surexpression compensatrice attendue d'*ADCK4*, une co-répression de ce dernier en présence de mutations *ADCK3*, et une corrélation entre le niveau de répression d'*ADCK4* et le taux résiduel en coenzyme Q10. Ces résultats suggèrent qu'*ADCK4* est également impliqué dans la régulation de la synthèse du coenzyme Q10 (Lagier-Tourenne *et al.*, 2008). L'analyse bioinformatique de la séquence *ADCK3* et des protéines apparentées montre également qu'elles forment une famille de kinases ancestrales ayant de lointaines similitudes avec les phosphoinositide-kinases et les choline-kinases, suggérant que le substrat d'*ADCK3* n'est pas nécessairement, ou probablement pas, une protéine. L'élucidation de la fonction d'*ADCK3* devrait permettre d'identifier un mécanisme primitif de régulation de la synthèse de l'ATP (chaîne respiratoire) par l'ATP lui-même (co-substrat de la kinase) et d'éclairer par un angle nouveau l'origine des mécanismes de régulation biologique par les kinases.

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

L'équipe étudie les bases moléculaires du syndrome de Coffin-Lowry (retard mental syndromique lié au chromosome X, comportant notamment des anomalies squelettiques progressives) et le rôle de la kinase RSK2 mutée dans ce syndrome et de ses homologues RSK1, 3 et 4. Des souris invalidées pour le gène RSK2 ont été créées précédemment par l'équipe. Elles présentent un retard de croissance osseuse (Yang *et al.*, 2004), des anomalies de la dentition (manuscrit en cours de

préparation) et des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale (Poirier *et al.,* 2006). L'équipe a récemment mis en évidence des anomalies de la voie dopaminergique au niveau du cortex de ces souris. Une étude par chromatographie HPLC, en collaboration avec le groupe de Michael Gruss (Université de Magdebourg) de différents neurotransmetteurs a en effet révélé une augmentation des concentrations en dopamine (+ 45 %, p = 0,001) au niveau du cortex, mais non de l'hippocampe. Tous les autres neurotransmetteurs étaient présents à des taux normaux. Ce résultat a conduit l'équipe à explorer l'expression et la phosphorylation de différents acteurs de la voie dopaminergique. Nous avons montré que le taux de la forme phosphorylée (active) sur la sérine 31 de la tyrosine hydroxylase (TH), l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines, était significativement augmenté dans le cortex de la souris KO-RSK2 alors que le taux de protéine TH totale est similaire chez les souris KO et les souris WT. La sérine 31 est essentiellement phosphorylée par la kinase ERK, et nous avons montré que le niveau des formes phosphorylées (activées) de ERK1/2 était nettement augmenté chez les souris mutantes (+ 50 %). Nous avons également observé des augmentations significatives des niveaux d'expression du transporteur de la dopamine (DAT) et du récepteur dopamine DRD2 chez les souris mutantes. Cette étude confirme enfin la fonction inhibitrice exercée par RSK2 sur la voie Ras-ERK (elle avait déjà été rapportée auparavant, mais basée sur des études *in vitro*). L'ensemble de ces résultats ont été publiés (Marques Pereira *et al.,* 2008). Les travaux en cours portent sur la caractérisation des conséquences de cette dérégulation du système dopaminergique pour la transmission synaptique.

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

Finalement, une comparaison des transcriptomes d'hippocampe de souris invalidées pour RSK2 et de souris sauvages a été réalisée. Elle a révélé des différences d'expression significatives pour une cinquantaine de gènes. La validation d'une dizaine de ces gènes par RT-PCR quantitative et par Western-blot a déjà été réalisée. Parmi les gènes validés dont l'expression est nettement augmentée dans l'hippocampe de souris déficientes pour RSK2, on trouve notamment un récepteur ionotropique, le facteur de transcription RunX et un facteur d'initiation de la traduction jouant un rôle très important dans la traduction locale au niveau des dendrites. La validation des autres gènes est en cours.

La recherche de nouveaux gènes de retard mental lié au X par l'étude de translocation X-autosome chez des femmes avec retard mental, qui avait été poursuivie ces dernières années, a été arrêtée. Le dernier cas étudié a montré que le point de cassure sur le chromosome X était localisé dans une région dépourvue de gènes, mais que le point de cassure autosomique interrompait le gène CDKL3 (une protéine kinase cdc2-related), faisant de ce gène exprimé dans le cerveau un candidat pour des formes autosomiques de retard mental (Dubos *et al.,* 2008).

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

L'équipe du D[r] S. du Manoir développe des stratégies d'étude des réarrangements chromosomiques (amplifications, délétions) des tumeurs solides par « CGH array » et analyse du transcriptome. Afin d'identifier des marqueurs génomiques pronostiques associés à des paramètres cliniques comme la survie, trois études ont été entreprises pour cribler les aberrations chromosomiques par CGH sur puces. Ces études rétrospectives construites sur des cohortes très homogènes concernent des carcinomes de l'ovaire (coll. N. Arnold), des cancers du poumon de type épidermoïdes et adénocarcinomes (coll. N. Martinet, Nancy). Notre étude épidémiologique concernant une série de 1 200 cancers du poumon opéré au CHU de Nancy depuis 1988 (constituant la tumorothèque de Nancy) confirme le besoin de marqueurs pronostics pour les patients de stade I-II dont 45 % meurent de récurrence (publication soumise). Nous avons réalisé deux études rétrospectives (Adénocarcinomes : 73 cas et Epidermoïdes : 76 cas) de cancers du poumon de stade I-II stratifiées en deux groupes (survie < 25 mois et > 60 mois) par CGH-array. Nous avons développé une approche statistique originale pour identifier les régions associées au pronostic. Pour les adénocarcinomes, une amplification est présente uniquement chez les courts survivants et plusieurs régions de gains et pertes sont trouvées préférentiellement chez ceux-ci. Pour les formes épidermoïdes, la région la plus amplifiée est située en 3q et contient le gène SOX2 (manuscrit en préparation). Plusieurs régions sont associées au mauvais pronostic. Pour les deux histologies, une ségrégation partielle est obtenue sur la base de ces aberrations. Ces signatures génomiques seront validées par un ensemble de procédures statistiques. Une confirmation par Q-PCR des aberrations trouvées devrait permettre de définir un set minimal de régions qui pourrait être à la base d'un prototype de test pronostique. L'expression des gènes candidats sélectionnées

par des filtres bibliographiques et bioinformatiques dans ces régions génomiques sera évaluée dans des tumeurs humaines primaires et dans des tests de croissance tumorale / micrométastase *in vivo* (souris Nudes).

Nous sommes impliqués dans un programme visant à faciliter l'interprétation de données de CGH sur puces dans le cadre de la description d'aneusomies segmentales pour des patients souffrant de retards mentaux, (programme DHOS en collaboration avec P. Jonveaux, Nancy), et dans le cadre d'une action du GIS maladies rares (en particulier, une étude initiée par le Prof. Hélène Dollfus, Faculté de Médecine de Strasbourg, visant à identifier de nouveaux gènes du syndrome de Bardet-Biedl). Pour faciliter l'interprétation des données des puces Agilent dans le contexte du retard mental, nous avons développé un programme automatisé, fournissant aux cliniciens une liste ordonnée des aberrations numériques ayant le plus de chances d'être causales du retard mental (sur la base de critères comme la taille et le contenu en gènes…) et devant être confirmées de façon prioritaire.

Dans le cadre de notre plateforme CGH-array, 190 cancers colorectaux ont été étudiés, 164 cancers du poumon (PNES-poumon) et 98 VADS (étude du groupe de B. Wasylyk, IGBMC). Ce travail visait à identifier une signature moléculaire pronostique de l'apparition ultérieure de métastases dans les cancers VADS par l'exploration du transcriptome et des aberrations génomiques. Cette étude publiée par le groupe de B. Wasylyk (Rickman D.S. *et al.,* 2008) rapporte plusieurs aberrations génomiques associées à la progression métastatique et pourraient être à la base du développement marqueurs pronostiques et de cibles thérapeutiques dans les cancers VADS métastatiques.

Liste des publications du groupe de génétique humaine de l'IGBMC (depuis juillet 2007)

Publications parues dans des revues de niveau international avec comité de lecture

2007

Cao C., Laporte J., Backer J.M., Wandinger-Ness A., Stein M.-P. Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. Traffic (2007) 8 : 1052-1067.

Echaniz-Laguna A., Nicot A.S., Carré S., Franques J., Tranchant C., Dondaine N., Biancalana V., Mandel J.L., Laporte J. Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel *dynamin* 2 gene mutation. Neuromuscular disorders (2007) 17 : 955-959.

Gribaa M., Salih M., Anheim M., Lagier-Tourenne C., H'mida D., Drouot N., Mohamed A., Elmalik S., Kabiraj M., Al-Rayess M., Almubarak M., Bétard C., Goebel H. and Kœnig M. A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localized at 16q21-q23. Brain (2007) 130 : 1921-1928.

Klein F., Pastore A., Masino L., Zeder-Lutz G., Nierengarten H., Oulad-Abdelghani M., Altschuh D., Mandel J.L. and Trottier Y. Pathogenic and non-pathogenic polyglutamine tracts have similar structural properties: towards a length dependent toxicity gradient. J. Mol. Biol. (2007) 371 : 235-244.

Marques Pereira P., Heron D. and Hanauer A. The first large duplication of the RSK2 gene identified in a Coffin-Lowry syndrome patient. Hum. Genet. (2007) 122 : 541-543.

Martelli A.*, Wattenhofer-Donzé M.*, Schmucker S., Bouvet S., Reutenauer L. and Puccio H. Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. Hum. Mol. Genet. (2007) 16 : 2651-2658.

Nicot A.S.*, Toussaint A.*, Tosch V., Kretz C., Wallgren-Pettersson C., Iwarsson E., Kingston H., Garnier J.M., Biancalana V., Oldfors A., Mandel J.L. and Laporte J. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. Nat. Genet. epub 2007 Aug 5. (2007) 39 : 1134-1139. * *equal contributors.*

2008

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

Boettcher C., Ulbricht E., Helmlinger D., Mack A.F., Reichenbach A., Wiedemann P., Wagner H.J., Seeliger M.W., Bringmann A., Priller J. Long-term engraftment of systemically transplanted, gene-modified bone marrow-derived cells in the adult mouse retina. British Journal of Ophthalmology (2008) 92 : 272-275.

Boulon S., Marmier-Gourrier N., Pradet-Balade B., Wurth L., Verheggen C., Jàdy B.E., Rothé B., Pescia C., Robert M.C., Kiss T., Bardoni B., Krol A., Branlant C., Allmang C., Bertrand E. and Charpentier B. The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs through conserved machinery. J. Cell Biol. (2008) 180 : 579-595.

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

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

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

Dubos A., Pannetier S. and Hanauer A. Inactivation of the *CDKL3* gene at 5q31.1 by a balanced t(X;5) translocation associated with nonspecific mild mental retardation. Am. J. Med. Genet. (2008) Part A 146A : 1267-1279.

Fukami M., Wada Y., Okada M., Kato F., Katsumata N., Baba T., Morohashi K., Laporte J., Kitagawa M. and Ogata T. Mastermind-like domain-containing 1 *(MAMLD1 or CXorf6)* transactivates the *Hes3* promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. J. Biol. Chem. (2008) 283(9) : 5525-32.

Khan A.O., Oystreck D.T., Kœnig M. and Salih M.A. Ophthalmic features of ataxia telangiectasia-like disorder. J. Am. Ass. Pediatr. Opht. Strabisms (2008) 12 : 186-189.

Lagier-Tourenne C., Tazir M., López L.C., Quinzii C.M., Assoum M., Drouot N., Busso C., Makri S., Ali-Pacha L., Benhassine T., Anheim M., Lynch D., Thibault C., Plewniak F., Bianchetti L., Tranchant C., Poch O., DiMauro S., Mandel J.L., Barros M.H., Hirano M. and Kœnig M. *ADCK3*, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. Am. J. Hum. Genet. (2008) 82 : 661-672.

Laugel V., Cossée M., Matis J., de Saint-Martin A., Echaniz-Laguna A., Mandel J.L., Astruc D., Fischbach M., Messer J. Diagnostic approach to neonatal hypotonia : retrospective study on 144 neonates. Eur. J. Pediatr. (2008) 167 : 517-523.

Marques Pereira P., Gruss M., Braun K., Foos N., Pannetier S., Hanauer A. Dopaminergic system dysregulation in the mrsk2_KO mouse, an animal model of the Coffin-Lowry syndrome. J. Neurochem. (2008) Sept. 24. [Epub ahead of print]

Nicot A.S. and Laporte J. Endosomal phosphoinositides and human diseases (Review). Traffic (2008) 9 : 1240-1249.

Piazzon N., Rage F., Schlotter F., Moine H., Branlant C., Massenet S. *In vitro* and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. J. Biol. Chem. (2008) 283 : 5598-610.

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

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

Zeniou-Meyer M., Liu Y., Béglé A., Olanish M., Hanauer A., Becherer U., Rettig J., Bader M.F. and Vitale N. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein RSK2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. Proc. Natl. Acad. Sci. (2008) 105 : 8434-8439.

Anheim M., Lagier-Tourenne C., Stevanin G., Fleury M., Durr A., Namer I.J., Denora P., Brice A., Mandel J.L., Kœnig M. and C. Tranchant. SPG11 spastic paraplegia : a new cause of juvenile parkinsonism. Original communication - Journal of Neurology (in press).

Articles de synthèse et chapitres de livres

Puccio H. Conditional mouse models for Friedreich Ataxia, a neurodegenerative disorder associating cardiomyopathy. Handb. Exp. Pharmacol. (Springer Verlag). 2007 ; (178) : 365-75. Review.

*Babady N.E., *Carelle N., Wells R.D., Rouault T.A., Hirano M., Lynch D.R., Delatycki M.B., Wilson R.B., Isaya G. and Puccio H. Advancements in the pathophysiology of Friedreich's Ataxia and new prospects for treatments. Molecular Genetics and Metabolism (2007) 92 : 23-35.

Toussaint A., Nicot A.S., Mandel J.L. and Laporte J. Mutations de l'amphiphysine 2 (BIN1) dans les myopathies centronucléaires récessives. M/S (2007) 12 : 1080-1082.

Anheim M., Chaigne D., Fleury M. Santorelli F.M., De Sèze J., Durr A., Brice A., Kœnig M., Tranchant C. : Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay : étude d'une famille et revue de la littérature. Revue Neurologique (2008) 164 : 363-368.

Puccio H (2008). *Multicellular models of Friedreich's Ataxia.* Journal of Neurology in press.

Rohde H.M., Tronchère H., Payrastre B. and Laporte J. *Detection of myotubularin phosphatases activity on phosphoinositides in vitro and ex vivo.* Methods in Mol. Biol. (2008) in press.

Conférences données par J.-L. Mandel
(depuis juillet 2007)

Conférences grand public

— 50e anniversaire de l'association genevoise (INSIEME) de parents de personnes avec handicap mental. Genève, le 24 mai 2008. « 50 ans de recherche génétique dans le domaine de la déficience mentale ».

— Université de Tous les Savoirs. Paris le 23 juin 2008. « Génome et médecine prédictive ».

Conférences scientifiques, participation à des congrès

— Conférence « Des molécules à la cognition : Un hommage à Jean-Pierre Changeux (Institut Pasteur, Paris) du 17 au 19 septembre 2007. « Genetics of mental retardation ».

— Assises de génétique humaine et médicale (Lille) du 17 au 19 janvier 2008. *Modérateur de session.*

— Strasbourg-Weizmann symposium on « Transmembrane signaling » (IGBMC, Strasbourg-Illkirch) 11 et 12 février 2008 *(co-organisateur).*

— « Myopathies centronucléaires : un lien inattendu entre phosphoinositides, dynamine 2 et amphiphysine » à l'Université Bordeaux 2, le 19 février 2008.

— Conférence « Maladies monogéniques, du gène aux malades et aux familles » Université Victor Segalen Bordeaux 2, le 19 février 2008.

— Colloque « Actualités dans le domaine des maladies monogéniques : mécanismes physiopathologiques, approches thérapeutiques » au Collège de France (Paris) 15 et 16 avril 2008. « De la drosophile à la souris : l'exemple du syndrome X fragile » (o*rganisateur du colloque).*

— VIII National medical genetics congress (Çanakkale - Turkey) du 6 au 9 mai 2008. « Fragile X syndrome : from diagnostic applications to pathomechanisms ».

— Colloque inaugural IFR148 « Sciences et ingénierie en biologie Santé », Brest le 4 juin 2008. « Maladies génétiques : aspects physiopathologiques et pistes thérapeutiques ».

— Colloque AFSTAL (Association Française des Sciences et Techniques de l'Animal de Laboratoire) « Bonnes pratiques animales : partager l'éthique au quotidien » Strasbourg, 4 au 6 juin 2008. « Les modèles génétiques animaux en recherche médicale ».