

**Compte rendu de la 10ème réunion annuelle du réseau français
"Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss et autres pathologies de l'enveloppe nucléaire"**

Vendredi 17 Décembre 2010, 9h30 - 16h30

Auditorium, Institut de Myologie, Bâtiment Babinski, Hôpital Pitié-Salpêtrière

Etaient présents :

Valérie Allamand
Christine Barnerias
Annie Barois
Anne-Marie Beaufrère
Henri-Marc Bécane
Rabah Ben Yaou
Nawal Berber
Véronique Béréziat,
Anne Bertrand
Guillaume Bidault,
Marc Bitoun
Gisèle Bonne
Célia Boutte
Tuy Nga Brignol
Brigitte Buendia
Emmanuelle Campanna-Salort
Nina Canki-Klain
Cyril Catelain
Marie Élodie Cattin
Philippe Charron
Khadija Chikhaoui
Catherine Coirault
Valérie Decostre
Laurence Demay
Annachiara De Sandre-Giovannoli,
Valérie drouin-garraud
Léonard Feasson
Anna Ferreiro
Xavier Ferrer
Anne-Claire Guénantin

Lucie Gueneau
Dalil hamroun
Sandra-Jimena Hernandez-Vallejo
Delphine Héron
Raoul Juntas-Morales
Jean Claude Kaplan
Olivier LASCOLS
Caroline Le dour
France Leturcq
Nicolas Levy
Edoardo Maleatti
Michèle Mayer
Montse Olive
Claire Navarro
Aurélie Papadoupoulos
Penisson Isabelle
Pascale Richard
Stéphanie Riveron
Patrice Roll
Miguel Angel Rubio
Pascal Sabouraud
Guilhem Solé
Nathalie STREICHENBERGER
Marie Christine Vantighem
Nicolas Vignier
Corinne Vigouroux
Thomas Voit
Karim Wahbi
Stéphanie Woerner

Programme

8h 45- 9h 30 : Accueil, Café / Thé / Viennoiseries

9h 30 - 9h 40 : Ouverture (R. Ben Yaou, F. Leturcq & G. Bonne)

9h40- 11h Les laminopathies du tissu adipeux et syndromes progéroides : (15+ 5)

9h40-10h C. Le Dour, S. Schneebeli, F. Bakiri, D. Jeziorowska, Y. Reznik, V. Béréziat, J. Capeau, O. Lascols et C. Vigouroux. Une mutation homozygote de la prélamine A empêchant sa farnésylation conduit à un phénotype lipodystrophique sévère.

10h-10h20 MC. Vantghem, L. Dieudonné et I. Wolowczuk. L'interleukine 7 (IL7) un senseur du rapport graisse viscérale sur graisse totale participant à l'insulino-résistance dans les syndromes lipodystrophiques ?

10h20-10h40 S. Hernandez, G. Bidault, S. Moritz, G. Lattanzi, J. Capeau, C. Vigouroux et V. Béréziat. Etude de l'effet de mutations des lamines A associées au FPLD, aux laminopathies métaboliques et à la progéria sur l'insulino-résistance cellulaire.

10h40- 11h10 A. De Sandre-Giovannoli, S. Sigaudy, P. Bourgeois, P. Roll, E. Jouve, G. Gorincour, J-C Gentet, N. André, P. Cau, J. Micallef et N. Lévy. Association de pravastatine et acide zoledronique dans un essai de phase II pour la Progeria de Hutchinson-Gilford : tolérance et efficacité à un an.

11h10-11h30: Pause



11h30- 12h50 Pathologies du muscle strié : L'EDMD dans tous ses états :

11h30-11h50 : R. Juntas-morales, L. Gueneau, A. De Sandre-Giovanoli, Y.J. Bignon, P. Richard, R. Ben Yaou et G. Bonne. Nouveau cas d'EDMD lié à L'insertion d'un rétrotransposon dans le gène *FHL1*. Particularités phénotypiques.

11h50-12h10 : N. Streichenberger, H. Gervais Bernard, P. Richard et F. Bouhour. Rigid spine syndrome et myopathie des ceintures évolutive.

12h10-12h30 : E. Salort-Campana, N. Philip, N. Lévy, J. Pouget et A. De Sandre-Giovanoli. "Un diagnostic urgent" dans un contexte de conseil génétique pour dystrophie musculaire rétractile isolée

12h50-14h15: Pause déjeuner.

14h15- 15h45 Modèles animaux et cellulaires :

14h15-14h45 C. Navarro, A. De Sandre-Giovanoli, C. Bartoli, P. Roubertoux, MG. Mattei, D. Depetris, P. Roll, P. Cau, J. Tazi, C. Lopez Otin et N. Lévy. Validation de modèles murins de Progeria pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

14h45-15h15 S. Woerner, I. Duband-Goulet, S. Gasparini, W. Attanda, S. Zinn-Justin et B. Buendia. Interaction entre SREBP1 et les lamines de type A sauvages ou mutées en des sites responsables de laminopathies : études in vitro

15h15-15h45 A.T. Bertrand, L. Renou, A. Papadopoulos, M. Beuvin, E. Lacène, T. Arimura et G. Bonne. Un défaut de la voie de signalisation SREBP1 lié à la délétion de la lysine 32 des lamines A/C est responsable de troubles métaboliques sévères chez les souris.

15h45- 16h15 Diagnostic moléculaire

15h45-16h P. Richard & L. Demay. Apport de la technique HRMA dans l'analyse moléculaire du gène *LMNA* et interprétation des résultats.

16h- 16h15 F. Leturcq, I. Nelson, N. Deburgrave, I. Marey, A. Vasson, V. Allamand, L. Orhant, P. Richard, G. Bonne, J. Chelly & N. Levy, M. Cossee. Le point sur le projet européen NMD-Chips: Mise en place de puces diagnostiques pour les maladies neuromusculaires.

La 10ème réunion annuelle du réseau français "Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss et autres pathologies de l'enveloppe nucléaire" a eu lieu le 17 Décembre 2010 et a été comme chaque année, pour les participants, l'occasion d'échanger, débattre et discuter de leurs expériences relatives à cette thématique. La session du matin a été consacrée aux laminopathies du tissu adipeux et syndromes progéroïdes alors que l'après midi a été dédiée aux pathologies du muscle strié.

Vous trouverez ci-dessous les résumés des présentations.

Résumés :

Une mutation homozygote de la prélamine A empêchant sa farnésylation conduit à un phénotype lipodystrophique sévère.

C. Le Dour, S. Schneebeli, F. Bakiri, D. Jeziorowska, Y. Reznik, V. Béréziat, J. Capeau, O. Lascols et C. Vigouroux.

INSERM UMR_S 938; Centre de Recherche Saint-Antoine; Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Paris.

Les mutations du gène codant les lamines A et C, protéines nucléaires ubiquitaires, sont responsables de maladies appelées "laminopathies", parmi lesquelles des lipodystrophies et des syndromes de vieillissement accéléré. Les anomalies de maturation post-traductionnelle de la lamine A, en particulier l'accumulation de prélamine A farnésylée, pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de ces maladies.

Nous rapportons ici une étude de corrélation génotype/phénotype chez des patients, tous originaires de l'île de La Réunion, et présentant une lipodystrophie partielle avec insulino-résistance sévère, hypertriglycéridémie et complications cardiovasculaires précoces, chez lesquels une mutation altérant la maturation de la lamine A (c.1961dup, p. p.T655fsX49) été mise en évidence.

Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture qui conduit à la synthèse d'une prélamine A plus longue, ne pouvant pas subir sa farnésylation post-traductionnelle physiologique. Pour la première fois dans les laminopathies métaboliques, cette mutation a été retrouvée à l'état homozygote chez sept sujets atteints. Ces patients n'expriment plus de lamine A mature et présentent un phénotype plus sévère que les porteurs hétérozygotes. La transmission de cette laminopathie est codominante avec pénétrance incomplète.

Dans les fibroblastes cutanés des patients, la prélamine A mutée est localisée au noyau, montrant que l'absence de farnésylation ne perturbe pas l'adressage de la protéine. La mutation induit des déformations nucléaires dans les cellules de patients homozygotes et hétérozygotes, semblables à celles observées dans des cellules portant la mutation R482W, mutation la plus fréquemment à l'origine des lipodystrophies. Les fibroblastes étudiés révèlent également un vieillissement cellulaire accéléré et une augmentation du stress oxydant.

Notre étude démontre pour la première fois, dans le domaine des laminopathies, que l'expression homozygote ou hétérozygote d'une prélamine A non farnésylée peut conduire à un phénotype lipodystrophique. Ces résultats infirment l'hypothèse de la responsabilité exclusive de la farnésylation persistante de la prélamine A dans la physiopathologie des laminopathies avec lipodystrophie.

Pour plus d'informations, voir Le dour et al. J Clin Endocrinol Metab 96: E856–E862, 2011.

L'interleukine 7 (IL7) un senseur du rapport graisse viscérale sur graisse totale participant à l'insulino-résistance dans les syndromes lipodystrophiques ?

MC Vantghem¹, L Dieudonné, I Wolowczuk².

1- Service d'Endocrinologie et Métabolisme, CHRU de Lille.

2- Université Lille Nord de France et Laboratoire de Neuroimmunoendocrinologie, IFR 142, Institut Pasteur de Lille.

Le mécanisme des lipodystrophies reste mal connu. L'IL7 agirait comme régulateur quantitatif et qualitatif de l'adiposité (Macia Plos One 2010*). Le **but** de ce travail était de comparer le profil métabolique, la répartition du tissu adipeux et l'IL7 de différentes lipodystrophies.

Méthodes : Nous avons comparé 25 patients avec mutation *LMNA*, 14 apparentés non mutés, 15 lipomatoses et 16 patients avec anomalie de répartition du tissu adipeux non mutés (ARTA). Les caractéristiques cliniques, métaboliques, le pourcentage de masse grasse (%MG) en DEXA, les quantités de graisse abdominale totale (GT) et intra-abdominale (GIA) (assimilable à la graisse viscérale) en IRM et l'IL7 ont été déterminées.

Résultats : La fréquence du diabète, les médianes d'IMC, HbA1C, glycémie et insulïnémie à jeun, leptinémie, %MG totale et tronculaire et volume de GT différaient significativement entre les groupes. Les « mutés » *LMNA* présentaient un IMC, une leptinémie et des rapports %MG tronculaire/IMC et GT/IMC inférieurs aux ARTA ($p < 0.05$) mais une insulïnémie supérieure ($p < 0.01$). L'IL7 ne différait pas entre les groupes, mais était positivement corrélée au rapport GIA/IMC, et négativement au rapport GT/GIA, à l'inverse de la leptine.

Conclusion : Devant une lipodystrophie, un IMC < 25 , un diabète avec hyperinsulinisme à jeun, une leptinémie < 10 ng/mL, un rapport MG tronculaire/IMC $<$ ou égal à 1.2 (DEXA) et un rapport GT/IMC < 12 (IRM) orientent vers une laminopathie. De plus, la quantité proportionnellement supérieure de GIA chez les mutés expliquerait la sévérité de l'insulino-résistance, tandis que l'IL7 semble correspondre à un senseur de l'équilibre graisse intra-abdominale/graisse totale

*Pour plus d'informations, voir Macia et al. PLoS One. 2010 Apr 1;5(4):e9953

Etude de l'effet de mutations des lamines A associées au FPLD, aux laminopathies métaboliques et à la progéria sur l'insulino-résistance cellulaire.

S. J. Hernández-Vallejo¹, G. Bidault¹, S. Moritz¹, G. Lattanzi², J. Capeau¹, C. Vigouroux¹ et Véronique Béréziat¹.

1- UMR_S 938, INSERM-UPMC Univ Paris 06 ; CDR St-Antoine, équipe J. Capeau, Paris, France.

2- IGM-CNR, Unit of Bologna, c/o IOR, Via di Barbiano 1/10 I-40136 Bologna, Italie.

Certaines mutations du gène *LMNA* sont responsables de la lipodystrophie partielle de Dunnigan ou de laminopathies dites « métaboliques », deux pathologies se caractérisant par une lipodystrophie plus ou moins prononcée associée à une insulino-résistance sévère, et s'accompagnant d'une accumulation anormale de prélamine A dans les cellules. Par ailleurs, la progéria de Hutchinson-Gilford, due à l'accumulation de progérine farnésylée, s'accompagne d'une lipoatrophie sous-cutanée, associée à une insulino-résistance.

Deux hypothèses pourraient expliquer l'insulino-résistance de ces patients. D'une part, il est connu que le stockage ectopique des lipides dans le foie, le muscle et le pancréas, secondaire à la lipoatrophie, inhibe la signalisation insulínique in vivo : ce phénomène est appelé lipotoxicité. D'autre part, les mutations de la lamine A pourraient directement affecter la réponse à l'insuline cellulaire. Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'insulino-résistance sévère des patients atteints de laminopathies métaboliques, dont la lipoatrophie est modérée voire absente.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des cellules CHO-IR (Chinese Hamster Ovary) surexprimant de façon stable le récepteur à l'insuline (-IR), modèle d'étude in vitro de la signalisation

insulinique. Nous avons transfecté transitoirement ces cellules avec des plasmides portant l'ADNc de la prélamine A sauvage ou mutée. Différentes mutations ont été utilisées : R482W responsable d'un syndrome lipodystrophique de Dunnigan typique, L92F responsable d'une laminopathie métabolique, la progérine, ainsi que 2 mutants artificiels L647R et C661M, conduisant respectivement à l'expression d'une forme farnésylée et non farnésylée de prélamine A. Nous avons étudié l'activation par phosphorylation de différentes protéines de la signalisation insulinique : le récepteur de l'insuline (IRb), l'un de ses substrats majeurs (IRS1), ainsi que des molécules impliquées dans les effets métaboliques (AKT) ou mitogéniques (ERK 1/2) de l'insuline.

L'étude de la localisation des lamines A exogènes montre différents phénotypes selon les mutations. Ainsi, la surexpression de la mutation R482W entraîne l'apparition de noyaux déformés (hernies), et d'agrégats intra-nucléoplasmiques de lamine A, également observés avec la mutation L92F. Ces deux mutations entraînent une accumulation de prélamine A sans altérer la signalisation insulinique. La progérine est, comme attendu, localisée à l'enveloppe nucléaire et entraîne la formation de replis nucléaires. Contrairement aux mutations R482W et L92F, la surexpression transitoire de progérine entraîne une inhibition de l'activation de ERK et AKT et de la synthèse d'ADN en réponse à l'insuline.

Afin de mieux caractériser l'impact de la farnésylation sur l'insulino-résistance cellulaire, nous avons utilisé les constructions artificielles C661M et L647R. La surexpression de la prélamine A non farnésylée (mutation C661M) induit la formation d'agrégats intra-nucléoplasmiques, similaires à ceux observés lors de la surexpression des mutations R482W et L92F. La mutation L647R présente, comme la progérine, une localisation à l'enveloppe nucléaire avec formation de replis. De façon intéressante, seule la mutation L647R induit une altération de l'activation d'ERK et d'AKT en réponse à l'insuline, ainsi qu'une diminution de la synthèse d'ADN en réponse à l'insuline, suggérant un rôle direct de la prélamine A farnésylée dans l'insulino-résistance cellulaire.

La réversion potentielle des atteintes observées par un traitement pharmacologique avec des inhibiteurs de farnésylation nous permettrait de confirmer l'importance de la farnésylation dans cette résistance à l'insuline cellulaire. Par ailleurs, des expériences complémentaires sont à menées pour mettre en évidence le lien entre l'accumulation de prélamine A farnésylée et la résistance à l'insuline. Plusieurs candidats pourraient être envisagés, en particulier le facteur de transcription c Fos, partenaire de la lamine A et acteur de la voie mitogénique de l'insuline.

Association de pravastatine et acide zoledronique dans un essai de phase II pour la Progeria de Hutchinson-Gilford : tolérance et efficacité à un an.

A. De Sandre-Giovannoli^{1,2}, S. Sigaudy², P. Bourgeois^{1,3}, P. Roll^{1,3}, E. Jouve⁴, G. Gorincour⁵, J-C Gentet⁶, N. André⁶, P. Cau^{1,3}, J. Micallef⁷ et N. Lévy¹.

1- Inserm UMR_S910, Génétique médicale & Génomique Fonctionnelle Faculté de Médecine de Marseille.

2- Laboratoire de Génétique Moléculaire; Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants La Timone, Marseille.

3- Laboratoire de Biologie Cellulaire, Hôpital d'enfants de la Timone, Marseille.

4- Unité de Pharmacologie Clinique et d'Evaluations Thérapeutiques, AP_HM, Marseille.

5- Service de radiologie générale et vasculaire, hôpital de la Timone, Marseille.

6- Service d'oncologie pédiatrique, Hôpital d'enfants de la Timone, Marseille.

7- Fédération de Pharmacologie et de Toxicologie, CHU Timone, Marseille, France.

La Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une pathologie génétique très sévère et rare, caractérisée par un vieillissement prématuré et une artériosclérose sévère et accélérée; les enfants atteints décèdent à l'âge moyen de 13,5 ans, le plus souvent d'infarctus du myocarde. La maladie est due à une mutation dominante, de novo, du gène *LMNA*, qui active un site d'épissage cryptique au niveau des transcrits codant la Lamine A issus du gène. Par conséquent, est produit un précurseur

tronqué de la Lamine A qui ne peut pas subir l'ensemble des modifications post-traductionnelles physiologiques. Ce précurseur aberrant, appelé « Progérine », s'accumule de façon ubiquitaire dans les noyaux cellulaires, où il exerce de nombreux effets toxiques. Sur la base des résultats précliniques obtenus sur les cellules des patients et un modèle murin de la pathologie (souris *Zmpste24*^{-/-}, Varela et al., Nat Med. 2008;14:767-72), nous avons pu démarrer un essai thérapeutique de phase II, ouvert, non randomisé, monocentrique, à l'Hôpital de la Timone Enfants, à Marseille, afin d'évaluer la tolérance et l'efficacité de l'association Pravastatine (Vasten®)/Zolédronate (Zometa®) sur différents paramètres de la maladie. Le traitement, agissant sur la voie métabolique produisant le farnésyl- et le géranylgeranyl-pyrophosphate, vise à réduire les niveaux de prénylation de la progérine, et, par conséquent, sa toxicité. A ce jour, 12 patients sont inclus dans l'essai. Le Vasten est administré per os quotidiennement et le Zometa par perfusion intraveineuse toutes les 6 à 12 semaines. La tolérance et l'efficacité à un an ont été évaluées sur 6 patients inclus dans l'étude entre Octobre 2008 et Mai 2009, dont 3 présentaient un phénotype HGPS classique et 3 un phénotype plus sévère, à expression néonatale. La tolérance au traitement a été très satisfaisante : aucun effet indésirable majeur n'a été observé et parmi les effets indésirables mineurs constatés, ceux qui étaient probablement liés au traitement ont été rapidement corrigés par une intervention appropriée. Plusieurs signes de maladie choisis comme paramètres d'efficacité, incluant notamment la prise de poids, la densité osseuse et des éléments d'évaluation du risque cardiovasculaire, ont été améliorés par le traitement, par rapport à l'histoire naturelle de la maladie. De plus, plusieurs parents ont rapporté une augmentation de l'appétit, du dynamisme et une repousse des cheveux et sourcils chez leurs enfants. L'essai thérapeutique va donc être poursuivi, bien entendu sous réserve qu'aucun évènement indésirable majeur ne se produise, pour se terminer entre février 2012 -pour les premiers patients inclus- et septembre 2013 -pour les derniers.

Nouveau cas d'EDMD lié à L'insertion d'un rétrotransposon dans le gène FHL1. Particularités phénotypiques.

R. Juntas-morales¹, L. Gueneau^{2,3}, A. De Sandre-Giovanoli⁴, Y.J. Bignon⁵, P. Richard⁶, R. Ben Yaou^{2,3} et G. Bonne^{2,3,6}.

1- Service de neurologie, CHRU de Montpellier, Montpellier.

2- Inserm, U 974; Paris

3- UPMC Univ Paris 6 UM 76 ; CNRS, UMR 7215 ; Institut de Myologie, Paris.

4- Inserm UMR_S910, Génétique médicale & Génomique Fonctionnelle Faculté de Médecine de Marseille; Laboratoire de Génétique Moléculaire; Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants La Timone, Marseille.

5-Département d'oncogénétique, Centre de Lutte contre le Cancer de la Région Auvergne, Centre jean Perrin, Clermont-Ferrand.

6- AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, service de Biochimie Métabolique, Paris.

C'est un patient de 42 ans sans antécédents familiaux, fils unique sans consanguinité parentale, sans facteurs de risque cardiovasculaires et faisant du sport de manière régulière. Son principal antécédent est une dysphonie depuis l'adolescence due à une paralysie des cordes vocales en abduction. A l'âge de 40 ans, il présente une dyspnée et des œdèmes des membres inférieurs d'apparition rapidement progressive. Le bilan cardiologique objective des signes d'insuffisance cardiaque sévère surtout droite (tachycardie, galop, reflux hépato-jugulaire) avec tachycardie sinusale, hypertrophie biauriculaire, grande hypertrophie ventriculaire gauche et troubles de la repolarisation secondaires à l'ECG. L'échographie cardiaque met en évidence une cardiopathie gauche à prédominance restrictive sans dilatation des cavités droites avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche de 30%. L'IRM cardiaque montre une hypertrophie myocardique asymétrique. L'évaluation neurologique a montré un déficit axial très important, une nuque raide avec cyphoscoliose et pectus excavatum, des

rétractions des coudes et chevilles. Il n'y avait pas de déficit des membres, ni d'atteinte faciale ou oculomotrice ni d'hyperlaxité distale mais uniquement des difficultés à sortir la langue. Le patient ne présentait pas de troubles mentaux. Sur le plan dermatologique, il existait une atrophie cutanée diffuse sans kératose, sclérose des doigts qui sont effilés, érythème non kératosique des saillies osseuses des coudes, genoux, doigts et orteils, des dilatations veineuses des membres inférieurs, dépilation globale avec une alopecie du vertex le tout évoquant un Syndrome de Werner. Les CPK était discrètement élevées (462 UI/L) et l'électromyogramme normal. Le patient a refusé la biopsie musculaire. Devant ce tableau clinique associant une myopathie rétractile avec atteinte cardiaque et des anomalies cutanées suggérant un syndrome de Werner, une analyse des gènes *LMNA*, *ZMPSTE24* et *RECQL2* n'a pas permis d'identifier de mutation.

De ce fait, une analyse du gène *FHL1* a été effectuée. Une première étape a montré que l'exon 4 de ce gène ne s'amplifie pas chez le patient. L'analyse de l'ADNc a montré une séquence anormale. Afin d'identifier l'anomalie d'origine sur l'ADN génomique, des longues PCR entre les exons 4 et 5 ont été entreprises et ont montré la présence d'un fragment d'environ 6 kb, non présent chez l'ADNg contrôle. Le séquençage pas à pas de ce fragment anormal a montré la présence d'un insert dans l'exon 4, qui contient une queue polyA et une séquence de 6033pb qui s'aligne avec des séquences de rétrotransposons de type LINE1. Cette séquence prédit un codon stop prématuré et une protéine FHL1 plus courte. Les rétrotransposons de type LINE (Long Interspersed repetitive Element) sont des éléments mobiles du génome, rétro-transcrits et capables de transposer sur le génome de manière autonome. Un LINE1 complet mesure environ 6 kilobases et contient 2 cadres ouverts de lecture, précédés d'une séquence s'apparentant à celle du promoteur de l'ARN polymérase II. Dans la plupart des cas, les LINE1 sont dupliqués de manière incomplète dans le génome, mais dans notre cas il semble que le LINE1 inséré soit complet. Enfin, une analyse protéique par western blot n'a pas permis de détecter la protéine FHL1 tronquée chez le patient contrairement aux contrôles où la protéine FHL1 est retrouvée à la taille attendue, suggérant que la protéine tronquée est dégradée chez le patient.

En conclusion, nous avons identifié une nouvelle mutation du gène *FHL1*, qui correspond à l'insertion dans un exon codant d'un rétro-transposon de type LINE1 et qui serait responsable d'un nouveau phénotype associant un EDMD avec des signes du syndrome de Werner.

Rigid spine syndrome et myopathie des ceintures évolutive.

N. Streichenberger¹, H. Gervais Bernard¹, P. Richard² et F. Bouhour¹.

1- Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon¹.

2- APHP, GH Pitié Salpêtrière, UF myogénétique et cardiogénétique, service de biochimie métabolique, Paris.

L'histoire d'un patient âgé de 18 ans présentant une myopathie rétractile a été présentée. Le patient est l'aîné d'une fratrie de 2 sans antécédents familiaux (en dehors d'un décès à 40 ans du grand-père paternel) et sans consanguinité parentale. Il a marché à l'âge d'un an et a fait du sport en club (tennis, foot) pendant son enfance. C'est à l'âge de 12 ans que les premiers troubles sont notés avec raideur axiale responsable de douleurs en gymnastique (roulade), difficulté et douleur à l'extension complète des coudes et démarche dandinante sans gêne à la montée des escaliers. La première consultation neurologique à l'âge de 15 ans objectiva un syndrome de la colonne raide diffus (menton-manubrium 14 cm), un flessum des coudes et genoux et des rétractions des tendons d'Achille et une atteinte myopathique axiale et des ceintures (pelvienne>scapulaire) responsable d'un signe du tabouret et de difficultés à courir. Il n'y avait pas d'atteinte faciale ou de myotonie.

L'évolution s'est faite vers l'aggravation progressive du déficit musculaire (course impossible, incapacité à monter les escaliers, limitation à 500 mètres du périmètre de marche en terrain plat) et des rétractions (flessum du coude). En parallèle, les évaluations cardiaques à 15 et 18 ans se sont révélées normales. Les explorations neuromusculaires ont comporté un dosage des CPK à 5 200

UI/ml, un dosage de la maltase acide qui s'est révélée normale et un examen électromyographique montrant des tracés myogènes sans myotonie. La biopsie musculaire montrait une dystrophie musculaire avec des aspects de corps réducteurs en NADH et des zones rouges fushinophiles au trichrome de gomori. L'étude en immunofluorescence, des protéines membranaires, émerine, collagène VI, Perlecan, desmine, alphaBcrystalline, myotiline, titin et téléthonine normales. De plus, l'étude du collagène VI et Perlecan sur fibroblastes issus de biopsie de peau s'est révélée normale. Sur le plan moléculaire, l'étude des gènes *SEPN1* et *LMNA* n'as pas montré de mutation Alors que l'analyse du gène *FHL1* a mis en évidence une mutation faux sens dans l'exon 5 (c.458 G>C, p.Cys153Ser) localisée dans le «Zinc coordinating résidu» du second «LIM domaine». Cette mutation a été aussi identifiée chez la mère asymptomatique du patient. Une mutation affectant le même acide aminé mais avec un changement d'acide aminé différent a été précédemment rapportée par Schessl et al. (*J Clin Invest.* 2008 Mar;118(3):904-12) dans 2 familles (p.P153R et p.P153Y) où les sujets atteints présentaient une myopathie infantile sévère avec rigid spine et corps réducteurs à la biopsie musculaire.

En raison de l'absence de corps réducteurs, de l'évolution différente des cas précédemment rapportés, et malgré l'absence d'atteinte cardiaque (le patient étant âgé de 18 ans au dernier bilan cardiologique), le cas du patient présenté est à rapprocher des formes EDMD-like précédemment rapportées dues à des mutations du gène *FHL1* (Gueneau et al. *Am J Hum Genet.* 2009 Sep;85(3):338-53). Le cas de ce patient illustre aussi la variabilité importante de l'expression phénotypique (clinique et histologique) d'une mutation du gène *FHL1* touchant le même acide aminé.

"Un diagnostic urgent" dans un contexte de conseil génétique pour dystrophie musculaire rétractile isolée.

E. Salort-Campana¹, N. Philip², N. Lévy², J. Pouget¹ et A. De Sandre-Giovanoli².

1- Centre de référence des maladies neuromusculaires et de la SLA, Marseille.

2- Département de génétique médicale, Marseille

L'histoire d'un patient âgé de 35 ans présentant une myopathie rétractile, dont la sœur se présente pour un conseil génétique au cours d'une grossesse, est rapportée. Le patient a acquis la marche de façon très précoce avec cependant des chutes fréquentes à partir de l'âge de 2 ans ½ et des rétractions des biceps brachiaux on été notées précocement ayant conduit à un premier bilan qui montrait des CPK normales. Après la biopsie musculaire, le diagnostic d'amyotrophie spinal de type Kugelberg-Welander à été retenu. Une 2ème évaluation neurologique à l'âge de 7 ans comportait un electro-neuromyogramme qui montrait une souffrance neurogène et une biopsie musculaire (biceps brachial) qui montrait une inégalité de taille des fibres importante, des phénomènes de nécrose-régénération et une fibrose adipeuse discrète le tout évoquant une dystrophie musculaire. Le patient a subi un allongement des tendons d'Achille à 12 et 15 ans. Lors de sa dernière évaluation en 2009 (34 ans), le patient présentait outre steppage bilatéral avec relevé de la position accroupie avec l'aide des mains, une musculature très grêle, des rétractions achilléennes et des biceps brachiaux sans rétraction des fléchisseurs des doigts, un déficit et amyotrophie des muscles huméraux, une scoliose, un aspect très atrophique des membres inférieurs prédominant sur les vastes internes. Les reflexes ostéotendineux étaient présents et il n'y avait pas d'anomalies cutanées. Des analyses en biologie moléculaire des gènes *DM1*, *DM2* et *SMN* se sont avérées négatives de même que le recherche de duplication-délétion sur le gène de la dystrophine.

Son père âgé de 62 ans présente ptosis bilatéral connu depuis de nombreuses années et un diabète insulino-requérant très mal équilibré. Un bilan réalisé en Italie avait montré une polyradiculonévrite à l'électro-neuromyogramme et un processus neurogène à la biopsie du quadriceps gauche. Une cure d'immunoglobulines s'est avérée inefficace. Son examen en 2009 permet de mettre en évidence un ptosis bilatéral sans atteinte faciale, des réflexes abolis aux membres inférieurs, diminués aux membres supérieurs, une amyotrophie distale des 4 membres, un déficit des releveurs des pieds

bilatéral, des inter-osseux, du court abducteur du pouce, une hypoesthésie en gants et en chaussettes, des oscillations yeux fermés à la manœuvre de Romberg avec élargissement du polygone de sustentation.

En 2009 (34 ans), un flutter auriculaire avec fonction ventriculaire gauche normale a été découvert chez le patient qui a été mis de ce fait sous Previscan

Devant le tableau de myopathie rétractile avec atteinte cardiaque, le diagnostic de myopathie d'Emery-Dreifuss a été soulevé et une mutation non rapportée de l'exon 5 du gène *LMNA* (c.854T>A, p. p.Val285Glu) a été identifiée chez la patient mais pas chez ses parents ni sa sœur. Cette mutation faux-sens est prédite comme pathogène. Une étude des ses effets sur l'épissage de l'exon 5 est en cours.

Malgré le traitement anticoagulant, le patient développa une embolie pulmonaire massive compliquée d'un coma hypercapnique ayant nécessité une trachéotomie.

Cette observation nous rappelle l'existence de formes très précoces de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss autosomique dominant et développant une atteinte cardiaque très tardivement. Ces formes peuvent parfois être confondues avec d'autres affections à début précoce posant le problème des frontières nosologiques de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss avec notamment les dystrophies musculaires congénitales.

Validation de modèles murins de Progeria pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

C. Navarro¹, A. De Sandre-Giovannoli¹, C. Bartoli¹, P. Roubertoux, MG. Mattei¹, D. Depetris¹, P. Roll¹, P. Cau¹, J. Tazi², C. Lopez Otin³ et N. Lévy¹.

1- Inserm UMR_S910, Génétique médicale & Génomique Fonctionnelle Faculté de Médecine de Marseille; Laboratoire de Génétique Moléculaire; Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants La Timone, Marseille.

2- CNRS, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, UMR5535, IFR122, Montpellier.

3- Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Espagne.

Nous avons développé deux modèles murins différents de Progeria (HGPS) afin (i) de répondre à plusieurs questions concernant les bases moléculaires de la pathologie et (ii) de disposer de modèles proches de la maladie humaine pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. La Progeria est une maladie rare caractérisée par un vieillissement prématuré et accéléré, causée par une mutation ponctuelle hétérozygote située dans l'exon 11 du gène *LMNA*, codant pour les lamines de type A. Il s'agit d'une mutation « silencieuse » (p.G608G) qui active en réalité un site cryptique d'épissage 5pb en amont de la mutation, entraînant la production d'un ARN délété de 150pb et la production d'une protéine tronquée dans sa partie C-terminale (la « Progerine »). Bien que reproduisant souvent fidèlement le phénotype clinique, les modèles murins produits jusqu'à ce jour par d'autres groupes ne reproduisent pas le mécanisme moléculaire observé chez l'homme, impliquant un épissage aberrant de la Lamine A et la production d'une protéine tronquée. Afin de mimer au plus près ce mécanisme, nous avons produit un modèle murin knock in en collaboration avec l'équipe de Bernard Malissen (CIML, Marseille). L'exon 11 murin a été substitué par un exon portant la transition C>T, homologue à celle retrouvée chez l'homme. Après croisement avec une lignée exprimant la protéine Cre de manière ubiquitaire nous avons obtenu des animaux hétérozygotes *Lmna*^{G609G/+}, homozygotes *Lmna*^{G609G/G609G} et sauvages. Les homozygotes présentent un phénotype sévère évocateur de HGPS : ils ont une durée de vie réduite (en moyenne 147 jours) ainsi qu'un retard de croissance important. Les souris *Lmna*^{G609G/G609G} présentent également une réduction de la force musculaire, mesurée par le test d'agrippement des pattes antérieures, dès 4 mois. Une dépilation a par ailleurs été observée, évoquant l'alopecie observée chez les enfants atteints. Les études moléculaires effectuées sur différents tissus des souris homozygotes âgées de 4 et 5 mois ont révélé une forte expression de

Progérine au niveau transcriptionnel et protéique, avec une faible expression résiduelle de lamine A sauvage, indiquant une activation du site cryptique d'épissage similaire à celle qui est observée chez les patients. Des expériences d'immunofluorescence sur fibroblastes ont mis en évidence, comme chez les patients, de nombreuses anomalies nucléaires pouvant être corrélées avec les quantités de Progérine. L'ensemble des données obtenues suggère que ce modèle reproduit fidèlement à la fois le phénotype et les anomalies moléculaires caractéristiques de la Progéria. Nous avons donc prévu de l'utiliser pour tester de nouvelles approches thérapeutiques (pharmacologiques ou basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens) afin de réduire les niveaux d'épissage aberrant.

Le deuxième modèle, transgénique, basé sur le système TET-OFF, a été réalisé au SEAT (Service d'Expérimentation Animale de Transgénèse et de Recombinaison Homologue, Villejuif). Dans ce contexte, le cDNA humain codant pour la progérine n'est exprimé qu'après croisement avec des souris exprimant de manière ubiquitaire la protéine tTA. L'avantage de ce modèle consiste en la possibilité d'interrompre à tout moment cette expression par l'administration de doxycycline dans l'eau de boisson. Deux lignées porteuses du transgène ont été obtenues : les lignées 25 (L25) and 39 (L39). Des analyses par FISH ont montré l'insertion du transgène dans les chromosomes 14 (2 sites) pour la L25 et 5 (1 site) pour la L39. Les croisements avec des souris exprimant la tTA sous promoteur ubiquitaire ont été initiés et les premiers animaux sont maintenant disponibles pour les analyses génétiques et phénotypiques. La caractérisation de ce modèle est en cours.

Interaction entre SREBP1 et les lamines de type A sauvages ou mutées en des sites responsables de laminopathies.

S. Woerner¹, I. Duband-Goulet¹, S. Gasparini², W. Attanda¹, S. Zinn-Justin² & B. Buendia¹

1- Laboratoire du Stress et Pathologies du Cytosquelette, Université Paris Diderot-Paris 7, CNRS, Institut de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, 4 rue M.A. Lagroua Weill Halle, 75205 Paris cedex 13, France

2- Laboratoire de Biologie Structurale et Radiobiologie, URA CNRS 2096, Commissariat à l'Energie Atomique Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Les lamines de type A (prélamine A, lamine A et lamine C) sont des protéines nucléaires de la famille des filaments intermédiaires qui se localisent entre l'enveloppe nucléaire interne et la chromatine ainsi que dans le nucléoplasme. Les lamines de type A ont de nombreux rôles au sein des cellules. Elles contribueraient notamment à la régulation de la transcription des gènes en interagissant/séquestrant certains facteurs de transcription. Il a été proposé que SREBP1, facteur de transcription de la famille bHLH impliqué dans l'adipogénèse, serait inactivé *via* son interaction avec la prélamine A, lorsque celle-ci est anormalement accumulée dans certaines laminopathies telles que la lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan (FPLD) (Capanni & al., 2005).

Dans notre étude, nous avons déterminé si le site de liaison de SREBP1 était spécifique à la prélamine A ou commun à toutes les lamines de type A. Nos tests *in vitro* de GST pull-down, de blot-overlay et d'ITC avec des protéines recombinantes ont montré que la région 227-487 de SREBP1a interagit avec la région carboxyl-terminale (C-ter) des lamines de type A, via un domaine commun à la prélamine A, la lamine A et la lamine C. De plus, la région carboxyl-terminale de la (pré)lamine A portant la mutation R482W, responsable de FPLD, est également capable d'interagir avec SREBP1 227-487 *in vitro*. Afin de tester si dans les cellules, la localisation de SREBP1 dépendait de son interaction avec les lamines via leur régions C-ter, nous avons développé un test de "co-adressage". Les cellules HeLa ont été transfectées afin de surexprimer la région 227-487 de SREBP1 fusionnée à la GFP (Green Fluorescent Protein) et à la séquence NoLS qui est une séquence d'adressage au nucléole, et/ou les régions C-ter de lamines. Dans les expériences de simple transfection, GFP-NoLS-SREBP1 227-487 se localise dans le nucléole dans la majorité des cellules alors que les C-ter de lamines A et C s'accumulent dans le nucléoplasme de toutes les cellules. En revanche, dans les expériences de co-transfection, la proportion de cellules où GFP-NoLS-SREBP1 227-487 localise dans les nucléoles diminue de façon significative. Cette observation suggère que

GFP-NoLs-SREBP1 227-487 est retenue dans le nucléoplasme via son interaction avec les C-ter de lamines.

En conclusion, nos résultats montrent que i) in vitro, l'interaction de SREBP1 (aa 227-487) avec les lamines de type A se fait via la région C-ter des lamines mais n'implique pas directement la séquence des 18 acides aminés spécifiques de la prélamine A, et ii) que dans les cellules, la localisation intranucléaire de SREBP1 (aa 227-487) est influencée par les lamines de type A.

Un défaut de la voie de signalisation SREBP1 lié à la délétion de la lysine 32 des lamines A/C est responsable de troubles métaboliques sévères chez les souris.

A.T. Bertrand^{1,2}, L. Renou^{1,2}, A. Papadopoulos^{1,2}, M. Beuvin^{1,2}, A. Angelini^{1,2}, E. Lacène³, T. Arimura^{1,2}, Y Gruenbaum⁴, G. Bonne^{1,2,5}.

1- Inserm, U 974; Paris

2- UPMC Univ Paris 6 UM 76 ; CNRS, UMR 7215 ; Institut de Myologie, Paris.

3- Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Paris.

4- Department of Genetics, The Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel.

5- AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, service de Biochimie Métabolique, Paris.

Le gène *LMNA* code pour les protéines nucléaires lamine A et C (lamines A/C) Les lamines A/C auraient un rôle structural au niveau de la membrane nucléaire, mais également un rôle de régulateur transcriptionnel sur de nombreuses voies de signalisation par ses interactions avec des facteurs de transcriptions tel que SREBP1 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1*). Des mutations du gène *LMNA* sont responsables de plus de 10 pathologies différentes qui touchent les tissus de manière isolée ou conjointe. Parmi ces pathologies, la L-CMD (pour *LMNA*-related congenital muscular dystrophy) est caractérisée par la précocité des faiblesses musculaires et des rétractions tendineuses. Afin de mieux comprendre les causes physiopathologiques de la L-CMD, nous avons reproduit chez la souris l'une des mutations responsable de cette pathologie, il s'agit de la délétion de la lysine en position 32 (Δ K32-Lamine A/C).

Les souris homozygotes meurent à environ 2 semaines après la naissance avec un retard général de croissance et une hypoglycémie sévère. Elles présentent une diminution de 80% de l'expression des lamines A/C malgré un taux normal d'ARNm. De plus, les lamines mutantes ne se structurent pas correctement sous la membrane nucléaire interne mais forme des agrégats dans le nucléoplasme. L'analyse des organes des souris homozygotes montre un défaut de maturation des muscles squelettiques et cardiaques, mais également de tissus adipeux blancs. SREBP1 étant impliqué dans la maturation du tissu adipeux, ainsi que dans la régulation du taux circulant de glucose, nous avons analysé l'expression de SREBP1 dans les animaux homozygotes. Ainsi, nous avons observé une diminution importante du taux global de SREBP1 dans le foie des souris homozygotes, avec une absence totale du précurseur en faveur de la forme active de SREBP1. Cette forme active entre correctement dans le noyau mais les gènes cibles de ce facteur de transcription ne sont pas activés. De manière intéressante, SREBP1 colocalise avec les agrégats de lamines A/C mutées.

Nous supposons que les lamines A/C mutées ne sont pas capable de s'assembler au niveau de la membrane nucléaire interne et sont en partie dégradées. Ces 2 phénomènes seraient responsables de la séquestration de SREBP1 dans les agrégats nucléoplasmiques, empêchant la transcription de ces gènes cibles et entraînant ainsi les défauts métaboliques et la mort des souris.

Apport de la technique HRMA dans l'analyse moléculaire du gène *LMNA* et interprétation des résultats.

P. Richard & L. Demay.

AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, service de Biochimie Métabolique, Paris.

La technique HRMA (High Resolution Melting Analysis) est une technique de criblage mettant en évidence des variations de séquence sans les identifier et permettant de distinguer une population variante au sein d'une population commune.

Cette technique est basée sur une analyse des courbes de fusion d'un fragment de PCR ; lors d'une dénaturation par la température, les fragments hétéroduplexes moins stables sont séparés (dénaturés) en premier puis séparation des homoduplexes (normaux et mutés). Elle est adaptée aux pathologies autosomiques dominantes présentant une hétérogénéité allélique ou, pour un fragment donné, un patient muté se distinguera clairement des patients normaux. Elle n'est par contre pas adaptée à la recherche de variants homozygotes.

Cette technologie a été mise au point pour l'analyse du gène *LMNA* pour les exons 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, et 11. Seuls les exons 1, 6, 7 et 12 restent analysés par séquençage direct car possèdent des polymorphismes gênant l'interprétation. Tous les types de mutations peuvent être identifiés (faux sens, juxta exoniques, délétions, insertions). Cette technique est entièrement automatisée sur LC480 (ROCHE Diagnostic) avec un débit rapide, un coût peu élevé et une grande sensibilité. Elle n'a pas permis d'augmenter le taux de mutations identifiées qui doit être optimal. Toutefois, une analyse exhaustive de l'ARN messager et une quantification allélique de *LMNA* pourrait certainement améliorer ce taux de détection.

Le point sur le projet européen NMD-Chips: Mise en place de puces diagnostiques pour les maladies neuromusculaires.

F. Leturcq¹, I. Nelson^{2,3}, N. Deburgrave¹, I. Marey¹, A. Vasson¹, V. Allamand^{2,3}, L. Orhant¹, P. Richard⁴, G. Bonne^{2,3,4}, J. Chelly¹ & N. Levy⁵, M. Cossee¹.

1- Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, GH Cochin, APHP, Paris.

2- Inserm, U 974; Paris

3- UPMC Univ Paris 6 UM 76 ; CNRS, UMR 7215 ; Institut de Myologie, Paris.

4- AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, service de Biochimie Métabolique, Paris.

5- Inserm UMR_S910, Génétique médicale & Génomique Fonctionnelle Faculté de Médecine de Marseille; Laboratoire de Génétique Moléculaire; Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants La Timone, Marseille.

Ce projet européen consiste en l'élaboration de puces diagnostiques CGH (pour la mise en évidence de grands réarrangements) et de séquençage (pour détecter les mutations ponctuelles). Ces puces permettent une analyse simultanée de 50 gènes impliqués dans les LGMD, dystrophies musculaires congénitales, myopathies congénitales et CMT. Cinq laboratoires français participent à ce projet.

Concernant les puces de CGH, des puces 12plex ont été modélisées en utilisant des sondes oligomères de 60 pb réparties sur les 50 gènes, couvrant exons, introns et promoteurs.

L'utilisation de patients contrôles, porteurs de délétions connues sur les gènes *FHL1* et *EMD* a permis de démontrer la fiabilité de ces puces dans la mise en évidence des grands réarrangements.

Concernant le séquençage haut débit, la validation de la stratégie est en cours. Un appel à collaboration clinique a été lancé en vue du recrutement de patients non résolus à analyser par ces puces.